

PROBLEME DER RADIOIMMUNOLOGISCHEN
WACHSTUMSHORMONBESTIMMUNG

Martin Gottsmann

1973

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn

PROBLEME DER RADIOIMMUNOLOGISCHEN
WACHSTUMSHORMONBESTIMMUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Martin Gottsmann
aus Traunstein

1973

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

PROBLEME DER RADIOIMMUNOLOGISCHEN

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. C. Scriba

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 6. 1973

vorgelegt von

Martin Goltmann

aus Traunstein



MEINEN ELTERN

ABKÜRZUNGEN

ACTH	= adrenocorticotropes Hormon
BPr	= bovines Prolaktin
HPr	= humanes Prolaktin
FFA	= free fatty acids = nicht veresterte Fettsäuren
GH	= growth hormone = Wachstumshormon
HCS	= humanes Chorionsomatotrophin
HGH	= human growth hormone = humanes Wachstumshormon
HPL	= human placental lactogen = HCS
HVL	= Hypophysenvorderlappen
I. E.	= Internationale Einheit
IHT	= Insulinhypoglykämietest
17-KS	= 17-Ketosteroide
LH	= Luteinisierungshormon
OGTT	= oraler Glukosetoleranztest
11-OHCS	= 11-Hydroxycorticosteroide
17-OHCS	= 17-Hydroxycorticosteroide
s	= Standardabweichung des Mittelwerts
sem	= Standardfehler des Mittelwerts
TSH	= thyreotropes Hormon
VK	= Variationskoeffizient
$\bar{x}$	= Mittelwert

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Liste der Abkürzungen

1.0.0.0.0	EINLEITUNG	1
2.0.0.0.0	METHODEN UND VORVERSUCHE	6
2.1.0.0.0	Radioimmunologische HGH-Bestimmung	6
2.1.1.0.0	Prinzip der Bestimmung und graphische Darstellung	6
2.1.2.0.0	Radioaktive Markierung des HGH	7
2.1.2.1.0	Isotopen	7
2.1.2.2.0	Reagenzien und Geräte	8
2.1.2.3.0	Jodierung	11
2.1.2.4.0	Berechnung der spezifischen Aktivität	12
2.1.2.5.0	Zählgeräte	14
2.1.3.0.0	Hydrodynamic Flow	15
2.1.3.1.0	Methode und Materialien	15
2.1.3.2.0	Variation der Albuminkonzentration	16
2.1.3.3.0	Alterung des Hormons	16
2.1.3.4.0	Aussagewert für die Markierung	18
2.1.4.0.0	Radioimmunoassay	18
2.1.4.1.0	Natriumsulfat-Präzipitationsmethode	19
2.1.4.1.1	Reagenzien	19
2.1.4.1.2	Verschiedene Salzkonzentrationen	19
2.1.4.1.3	Titration des HGH-Antiserums	21
2.1.4.1.4	Serummeßwerte	21
2.1.4.2.0	Dextran-coated Charcoal Radioimmunoassay	23
2.1.4.2.1	Prinzip	23
2.1.4.2.2	Reagenzien und Materialien	24
2.1.4.2.3	Herstellung des Adsorbens	24
2.1.4.2.4	Titration des Antikörpers	26
2.1.4.2.5	Spezifität des HGH-Antikörpers (Ziege)	27

2.1.4.2.6	Vorinkubation, Inkubationszeit und -temperatur	28
2.1.4.2.7	Präzision und Sensitivität	29
2.1.4.3.0	Solid Phase-Methode	30
2.1.4.3.1	Materialien und Methoden	31
2.1.4.3.2	Inkubationszeit	32
2.1.4.3.3	"Within assay" - Variationskoeffizient	33
2.1.4.4.0	Doppelantikörpermethode	34
2.1.4.4.1	Reagenzien und Methode	34
2.1.4.4.2	Hämolyse	36
2.1.4.4.3	Auftauversuch	38
2.1.4.4.4	Verdünnungseffekt	38
2.1.4.4.5	Einfluß der hitzelabilen Komplementfraktion	38
2.1.4.4.6	Präzipitation, Reaktionskinetik und Inkubation	40
2.1.4.4.7	Qualitätskontrolle	44
2.1.4.4.7.1	"Within assay" - Variationskoeffizient	44
2.1.4.4.7.2	"Between assay" - Variationskoeffizient	44
2.1.4.4.7.3	Präzisionsserum und Wiederfinderate	45
2.1.4.4.7.4	Sensitivität	45
2.1.4.4.7.5	Spezifität	46
2.1.4.5.0	Methodenvergleich	46
2.1.4.5.1	Solid Phase - Doppelantikörper	46
2.1.4.5.2	Charcoal - Doppelantikörper	46
2.2.0.0.0	HCS-Bestimmung	47
2.2.1.0.0	Präzisionsserum	49
2.2.2.0.0	Komplement	49
2.2.3.0.0	Spezifität	50
2.3.0.0.0	Blutglukosebestimmung	51
2.4.0.0.0	Bestimmung der FFA	52
2.5.0.0.0	Insulinhypoglykämietest	55
2.6.0.0.0	Jugulariskatheter	55
2.7.0.0.0	Argininbelastung	56
2.8.0.0.0	Cortisolbestimmung	56
2.9.0.0.0	Oraler Glukosetoleranztest (OGTT)	56

3.0.0.0.0	ERGEBNISSE	58
3.1.0.0.0	Untersuchungen zur Immunoreaktivität von HGH und HCS	58
3.1.1.0.0	Standardpräparationen	58
3.1.1.1.0	NIH-Wachstumshormon	59
3.1.1.2.0	Abbott-HGH	60
3.1.1.3.0	Kabi-HGH	60
3.1.2.0.0	Kreuzreaktionen mit dem HGH-Antikörper	62
3.1.2.1.0	Kreuzreaktion mit HCS	62
3.1.2.2.0	Kreuzreaktion mit TSH	62
3.1.2.3.0	Kreuzreaktion mit LH	63
3.1.2.4.0	Kreuzreaktion mit Rinderprolaktin	63
3.1.3.0.0	HGH-Bestimmung bei Galaktorrhoe	64
3.1.4.0.0	HGH-Bestimmung in der Schwangerschaft	65
3.1.4.1.0	HGH- und HCS-Bestimmung	65
3.1.4.2.0	Kreuzreaktion mit dem HCS-Antikörper	66
3.1.4.2.1	Kreuzreaktion mit HGH	66
3.1.4.2.2	Kreuzreaktion mit TSH und LH	67
3.1.4.3.0	Verdünnungskurven im HCS-System	67
3.1.4.4.0	Verdünnungskurven von Schwangerenserum im HGH-System	67
3.1.5.0.0	Verdünnungskurven bei der Akromegalie	70
3.1.5.1.0	Nüchternserum	70
3.1.5.2.0	Nüchternserum, zentral und peripher	71
3.1.6.0.0	Verdünnungskurven bei Normalpersonen (IHT)	72
3.1.6.1.0	Einzelwerte	72
3.1.6.2.0	Mittelwerte	74
3.1.6.3.0	Darstellungsmöglichkeiten der Verdünnungs- kurve	78
3.2.0.0.0	Vergleichende Bestimmungen: Vena cubiti- Bulbus cranialis venae jugularis internae	80
3.2.1.0.0	Akromegalie	80
3.2.1.1.0	Zentral-periphere HGH-Differenz	80
3.2.1.2.0	Biologische Halbwertszeit von HGH	81

3.2.2.0.0	Normalkollektiv	83
3.3.0.0.0	Forbes-Albright-Syndrom	89
3.3.1.0.0	Kasuistik	89
3.3.1.1.0	Anamnese	89
3.3.1.2.0	Befunde bei Aufnahme und während des Verlaufs	90
3.3.1.2.1	Klinische Befunde	90
3.3.1.2.2	Röntgenaufnahme des Schädels	90
3.3.1.2.3	Allgemeine Laboruntersuchungen	90
3.3.1.2.4	ACTH-Test	91
3.3.1.2.5	LH im Urin und Serum	91
3.3.1.2.6	Stimulation der TSH-Sekretion mit Thyreotropin-Releasing-Hormone (TRH)	92
3.3.1.2.7	Insulinhypoglykämietest	93
3.3.1.2.8	Argininbelastung	93
3.3.1.2.9	Oraler Glukosetoleranztest	94
3.3.1.2.10	Prolaktin	97
3.3.1.2.11	Mikroskopische und elektronenmikroskopi- sche Untersuchung des Tumorgewebes	98
3.3.2.0.0	Normalwerte des Insulinhypoglykämietestes und der Argininbelastung	98
4.0.0.0.0	DISKUSSION	101
5.0.0.0.0	ZUSAMMENFASSUNG	114
Literaturverzeichnis		117
Lebenslauf		

1.0.0.0.0 EINLEITUNG

Wachstumshormon

1909 entdeckte ASCHNER, daß bei Hunden nach der Hypophysektomie das Wachstum zum Stillstand kam. EVANS et al. (34, 35, 97) konnten 1921 bei Ratten mit Rinderhypophysenextrakten einen Riesenwuchs erzeugen. LI hat 1944 dieses wachstumsfördernde Prinzip aus Rinderhypophysen und 1956 aus menschlichen Hypophysen isolieren können (92). 1966 hat wiederum LI die Primärstruktur des Wachstumshormon (HGH = human growth hormone) aufgeklärt und 1971 gelang ihm die Synthese. Da dieses synthetische HGH nur eine biologische Aktivität von 10 % aufwies, mußte die ursprünglich angenommene Primärstruktur revidiert werden (89).

Struktur des HGH

Das menschliche Wachstumshormon ist ein einkettiges Polypeptidhormon mit 190 Aminosäuren, das durch zwei Disulfidbrücken vernetzt ist (79, 89). Nach NIALL hat HGH 191 Aminosäuren (108a). Das Molekulargewicht beträgt 21 500 und der isoelektrische Punkt liegt bei pH 4,9 (92). Wachstumshormon ist artspezifisch bezüglich biologischer Wirkung und immunologischer Aktivität (92). Zur Messung von HGH-Konzentrationen im Hypophysenextrakt gibt es biologische Tests wie den Rattentibiastest (35), die Gewichtszunahme von hypophysektomierten Mäusen (114) oder die Messung des Sulfateinbaus in Knorpelgewebe (in vitro-Test) (79). Zur Erfassung von Serum-HGH-Spiegeln eignet sich allein die radioimmunologische Bestimmungsmethode, deren Prinzip von BERSON und YALOW 1960 zur Insulinbestimmung entwickelt wurde (152) und 1962 erstmals von UTIGER et al. (144) auf die HGH-Bestimmung angewandt wurde.

Regulation der HGH-Sekretion

HGH wird in den eosinophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet. Die Hypophyse enthält etwa 5 mg HGH, was der zehnfachen Tagesproduktion entspricht (141, 149). Die Stimulation der Synthese und Sekretion erfolgt vom Hypothalamus aus durch den Growth Hormone Releasing-Faktor (GRF) (149). Dabei soll es sich um ein Dekapeptid mit dem Molekulargewicht 2500 handeln (131). Zusätzlich wurde ein Growth Hormone Inhibiting-Faktor (GIF) beschrieben (78). Die Struktur eines die GH-Sekretion hemmenden hypothalamischen Faktors wurde kürzlich aufgeklärt (15a). Danach handelt es sich um ein Peptid mit 14 Aminosäuren. Eine Spezifität scheint nicht zu bestehen.

Die HGH-Sekretion wird durch Hypoglykämie oder raschen Blutzuckerabfall, Fasten, körperliches Training, Schmerz, Stress, Trauma, chirurgische Eingriffe und Beginn der Tiefschlafphase stimuliert, ebenso durch Arginin, Glukagon, Östrogene und Pyrogene. Die insulininduzierte Hypoglykämie und die intravenöse Argininbelastung sind als Funktionsteste zur Bestimmung der Hypophysenvorderlappenfunktion in der Klinik eingeführt. Pathologisch erhöhte HGH-Spiegel finden sich bei Akromegalie, Gigantismus (79) und in seltenen Fällen (ektopische HGH-Produktion) beim Bronchial-Ca (137). Die HGH-Spiegel im Serum des Feten sind viermal höher als im mütterlichen Blut (45, 72, 156). HGH ist nicht placenta-gängig (84, 85). Glukose, Corticosteroide, Gestagene, Phentolamin und Sedativa vermindern die HGH-Sekretion. Eine verminderte HGH-Stimulierbarkeit wird bei Hypophysenvorderlappeninsuffizienz, idiopathischem HGH-Mangel, Hypothyreose, Schwangerschaft und Läsionen im Hypothalamus oder am Hypophysenstiel gefunden (79).

Stoffwechselwirkung des HGH

HGH wirkt anabol in der Anwesenheit von Insulin. Es fördert die

Eiweißsynthese durch verstärkten Transport von Aminosäuren in die Zellen und durch gesteigerte Synthese der Transfer-RNA. HGH fördert die Lipolyse im Fettgewebe. Beim Fasten werden folglich vor allem die Fettdepots abgebaut. HGH wirkt diabetogen, weil es die Glukoseaufnahme im Fett- und Muskelgewebe hemmt und die Insulinempfindlichkeit herabsetzt. Akut hat HGH allerdings einen Insulin-synergistischen Effekt. Intravenöse Gabe von HGH führt initial zum Abfall des Blutzuckers und der FFA-Spiegel (157). In der Leber wird durch das erhöhte Angebot von freien Fettsäuren die Glukoneogenese stimuliert. Der Diabetes mellitus eines pankreatektomierten Hundes bessert sich nach Hypophysektomie (Houssay-Phänomen). Unter Wachstumshormon nimmt die Natrium-, Kalium-, Phosphor- und Chloridausscheidung im Urin ab, die Kalziumausscheidung eher zu. Im Serum steigt daher der Phosphat-spiegel an (79).

Humanes Chorionsomatamammotropin

1962 isolierten JOSIMOVICH et al. (69) aus der menschlichen Plazenta ein dem HGH ähnliches Protein, das sie human placental lactogen (HPL) nannten. Nach LI et al. (91) wurde es später HCS, d.h. human chorionsomatamammotropin, genannt. LI hat die Primärstruktur dieses Hormons aufgeklärt (88). Es handelt sich um ein Polypeptidhormon aus 190 Aminosäuren mit Molekulargewicht 21 600. Täglich werden 1,4 - 4 g sezerniert (3, 6, 72). Neben der Wachstumsförderung wirkt es lipolytisch, diabetogen, mammo- und luteotrop. Weiter fördert es die Steroidbiosynthese in der Plazenta. Drei Wochen nach der Befruchtung bildet der Synzytiotrophoblast bereits HCS und nach sechs Wochen ist das Hormon im Blut nachweisbar. Der Serumspiegel steigt bis zur 37. Schwangerschaftswoche auf einen Maximalwert von $8,1 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ an (46). 3 - 4 Stunden nach totaler Plazentaentfernung ist HCS nur noch in Spuren im Serum der Mutter nachweisbar (3). Im Serum des Fetus finden

sich nur minimale HCS-Spiegel (3, 45, 72). Erniedrigte HCS-Spiegel im mütterlichen Serum finden sich bei allen Formen der Plazenta-insuffizienz. Bei Mehrlingsschwangerschaften sind die HCS-Spiegel erhöht.

Prolaktin

Während das mammotrope HCS nur in der Schwangerschaft auftritt, sezerniert die menschliche Hypophyse ein dem HGH ähnliches, mammotropes Hormon, Prolaktin genannt, auch außerhalb der Schwangerschaft (15, 39, 76, 116, 143). Auch wir konnten in der vorliegenden Arbeit zeigen, daß Prolaktin von den azidophilen, erythrosinophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens sezerniert wird (56). Vom Hypothalamus wird ein Prolaktin-Inhibiting-Faktor (PIF) sezerniert. Ob TRH, das Thyreotropin-Releasing-Hormon, auch der einzige Prolaktin-Releasing-Faktor ist, ist noch nicht eindeutig bewiesen. Eine vermehrte Prolaktinsekretion führt zur Galaktorrhoe. Außerhalb der Laktationsperiode kann eine Galaktorrhoe auch bei azidophilen und chromophoben Hypophysenadenomen (z.B. FORBES-ALBRIGHT-Syndrom) (20, 95, 120), bei Mangel an Prolaktin-Inhibiting-Faktor z.B. nach Hypophysenstiieldurchtrennung oder Behandlung mit Phenothiazin, Alphamethyl dopa, Ovulationshemmern, Testosteron, Cortisol und Reserpin auftreten (79). Die normalen, radioimmunologisch gemessenen Nüchternspiegel sind niedriger als 25 ng Prolaktin/ml (Kapitel 3.3.1). Prolaktin stimuliert in der Milchdrüse die Synthese der Laktosesynthetase und die Synthese des Caseins (79).

Radioimmunologische HGH-Bestimmung

In der vorliegenden Arbeit wird über vier Methoden zur radioimmunologischen Wachstumshormonbestimmung berichtet. Die Sensitivität, Spezifität und Präzision der einzelnen Methoden werden vergli-

chen. Die Kreuzreaktion von HCS, LH, TSH, Rinderprolaktin und humanem Prolaktin mit dem HGH-Antikörper werden untersucht. Aus der eindrucksvollen Kreuzreaktion des HCS mit dem HGH-Antikörper ergeben sich Probleme bei der Bestimmung der HGH-Spiegel in der Schwangerschaft. Von GREENWOOD et al. (53) wurden die aus der Kreuzreaktion resultierenden Veränderungen allgemein als Änderungen der HGH-Immunoreaktivität bezeichnet. Ausgehend von dieser Beeinflussung der HGH-Bestimmung durch ein kreuzreagierendes Molekül untersuchen wir die Immunoreaktivität von exogenem und endogenem HGH. Dabei wird eine Veränderung der Immunoreaktivität im Verlauf eines Insulinhypoglykämietestes beobachtet, was einen Hinweis für eine im Serum zirkulierende HGH-Vorstufe darstellen könnte. Weiter untersuchen wir die HGH-Spiegel im Bulbus cranialis der Vena jugularis interna (= zentral) und vergleichen sie mit den peripheren HGH-Spiegeln. Daraus sollte die endogene biologische Halbwertszeit des HGH berechnet werden. Mit der vergleichenden Messung von HGH zentral und peripher sollte ursprünglich die Frage geklärt werden, ob bei adipösen Patienten eine verminderte HGH-Sekretion der Hypophyse oder aber eine vermehrte Bindung von HGH in der Peripherie z. B. durch die große Oberfläche der Fettzellen vorliegt. Weiterhin wird eine Patientin mit einem prolaktinsezernierenden Hypophysentumor (FORBES-ALBRIGHT-Syndrom) beschrieben. An Hand dieses Falles sollen die Möglichkeiten der Hypophysenvorderlappen-Funktionsdiagnostik aufgezeigt werden.

2.0.0.0.0 METHODEN UND VORVERSUCHE

2.1.0.0.0 Radioimmunologische HGH-Bestimmung

2.1.1.0.0 Prinzip der Bestimmung und graphische Darstellungsmöglichkeiten der Eichkurve

1960 wurde die immunologische Isotopenverdünnungsmethode von YALOW und BERSON zur Messung von Seruminsulinspiegel beim Menschen eingeführt (152). Dieses Prinzip hat eine weite Verbreitung gefunden, da damit Konzentrationen verschiedenster Substanzen in Nano- bis Picogramm/ml erfaßt werden können. Es beruht auf der Konkurrenz von radioaktivmarkiertem Antigen (z. B. HGH-¹³¹J) und unmarkiertem Antigen (z. B. HGH) um die Bindungsstellen am Antikörper. Die Konkurrenz unterliegt dem Massenwirkungsgesetz, wobei allerdings markiertes und unmarkiertes Antigen nicht völlig gleich reagieren (33). Die Menge des antikörpergebundenen ("bound") markierten Antigens ist umgekehrt proportional, die Menge des ungebundenen ("free") markierten Antigens ist direkt proportional der zugegebenen Menge des unmarkierten Antigens. So läßt sich mit bekannten Standardkonzentrationen des Antigens bei konstanter Antikörpermenge und zugesetztem markiertem Antigen eine Eichkurve aufstellen, mit der die Konzentration des Antigens in einer unbekannten Probe bestimmt werden kann. Dies setzt voraus, daß der Antigen-Antikörperkomplex vom freien Antigen getrennt worden ist. Zu diesem Zweck sind verschiedene Methoden entwickelt worden. Sie lassen sich nach CATT (21) in drei Gruppen einteilen:

- 1) Trennung durch verschiedene Mobilität von "bound" and "free":
z. B. Chromatographie, Elektrophorese, Gelfiltration
- 2) Trennung durch selektive Entfernung des Antigen-Antikörperkomplexes: z. B. Doppelantikörpermethode, Salzpräzipitation, Solid-Phase-Methode
- 3) Trennung durch Absorption des freien Antigens: z. B. Ionenaustauscher, Charcoal, Talkum.

Die von YALOW und BERSON verwendete Darstellung der Eichkurve, in Anlehnung an SCATCHARD (130), hat folgende Eigenschaften: Abszisse und Ordinate sind linear. An der Abszisse wird die Antigenmenge oder -konzentration aufgetragen, an der Ordinate der Quotient aus "bound" und "free". Die resultierende Funktion ist etwa eine Hyperbel. Die Nachteile dieser Darstellung sind: 1) Die Nichtlinearität der Kurve, 2) die Instabilität der B/F-Ratio und 3) der von Test zu Test stark schwankende B_o -Wert, d. h. die gebundene Radioaktivität derjenigen Probe, die nur markiertes Antigen aber kein unmarkiertes enthält (124a). Deshalb bildeten wir für die HGH-Bestimmung den stabileren Quotienten B/B_o und erreichten damit zugleich einen konstanten Anfangspunkt der Kurve mit $B/B_o = 100\%$. Teilt man das Koordinatenkreuz linear ein, so enthält auch diese Kurve kein lineares Stück. Zur statistischen Auswertung und zur Berechnung der Kurve mittels der linearen Regression ist dies erforderlich. Deshalb teilten wir später die Abszisse nach dem dekadischen Logarithmus ein. Es resultierte eine Gerade zwischen den Standardkonzentrationen 1, 25 ng HGH/ml und 5 ng HGH/ml (Sorin-HGH-Test-Kit). Um die Länge der Geraden über einen größeren Bereich auszudehnen, verwendeten wir die Logit-Darstellung nach RODBARD et al. (124a). Auf der Ordinate wird $\text{logit } B/B_o = \ln \frac{B/B_o}{1 - B/B_o}$ aufgetragen, auf der Abszisse $\text{logit } K$ (K = Konzentration des Standardantigens). Die Gerade überstreicht den Bereich $\text{logit } x_1 = -2,2$ bis $\text{logit } x_2 = +2,2$. Im Sorin-Test-Kit entspricht das etwa den HGH-Standardkonzentrationen 0,5 ng/ml bis 10 ng/ml. Eine vergleichende Darstellung folgt in Kapitel 3.1.1.

2.1.2.0.0 Radioaktive Markierung des HGH

2.1.2.1.0 Isotopen

Um eine radioaktive Tracersubstanz zu erhalten, markiert man das Proteohormon, in unserem Fall das Wachstumshormon mit den Jod-

isotopen ^{125}J oder ^{131}J . Die Isotopen sind wie folgt charakterisiert: ^{125}J weist Gammastrahlung und Elektroneneinfang auf, mit einer spezifischen Aktivität des trägerfreien Isotops von 57 pg/Ci. Die Halbwertszeit beträgt 60 Tage. Für ^{131}J gilt: β - und γ -Strahlung mit einer spezifischen Aktivität des trägerfreien Isotops von 8,1 pg/Ci und 8,09 Tage Halbwertszeit. Der Vorteil des ^{131}J ist die hohe spezifische Aktivität. ^{125}J wird bevorzugt, weil die Halbwertszeit länger ist und der Isotopengehalt der käuflichen Präparationen bei 80-100 % des Gesamtjods liegt, für ^{131}J -Präparationen dagegen nur bei 15-20 % (75). Bei der Markierung nach GREENWOOD et al. (53) wird Jodid durch das Oxydationsmittel Chloramin T in elementares Jod umgewandelt, das mit dem Wasserstoffatom am Tyrosinrest des Proteins in Austausch tritt. Allerdings können dabei auch die Sulphydrilgruppen oxidiert werden, was zu dem "damaged hormone"-Anteil beiträgt (124b). Die Oxydation wird durch Natriumbisulfit gestoppt, das den Rest des freien Jods wieder zu Jodid reduziert. Der Träger Kaliumjodid soll eine unspezifische Adsorption des Jodids an die Wand des Reaktionsgefäßes verhindern. Von U. ROSA wurde eine elektrolytische Markierungsmethode entwickelt (124b). Nach dieser Methode wird das ^{125}J -HGH des später beschriebenen Sorin-Kit bereitet.

2.1.2.2.0 Reagenzien und Geräte

- 1) ^{131}J -Natriumjodid zur Eiweißmarkierung ohne Reduktionsmittel, spez. Aktivität 5-20 Ci/mg, Gesamtaktivität $2\text{mCi} \pm 10\%$ (Farbwerke Höchst AG, Frankfurt, Best.-Nr. J 1006)
- 2) Natriumdisulfit, trocken, MG 190,1 (Reagenzien Merck, Nr. 6528)
- 3) Kaliumjodid, neutral, MG 166,01 (Reagenzien Merck, Nr. 5043)
- 4) Chloramin T, MG 281,69 (Reagenzien Merck, Nr. 2426)
- 5) 5,5-Diäthylbarbitursäurenatriumsalz zur Analyse (Barbitalnatrium)

- 6) Kaliumdihydrogenphosphat nach Sörensen, MG 136,09 (Reagenzien Merck, Nr. 4873)
- 7) Di-Natriumhydrogenphosphat-Hydrat zur Analyse, MG 177,99 (Reagenzien Merck, Nr. 6580)
- 8) 5 N Salzsäure
- 9) 2 N Natronlauge (Reagenzien Merck, Nr. 9136)
- 10) Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst, elektrophoret.
Reinheitsgrad 100 % (Behringwerke AG, Best.-Nr. ORHD)
- 11) Menschliches Wachstumshormon (= HGH)
NIH - GH : HS 1394 (National Institute of Health, Bethesda)
- 12) Sephadex G 50 Fine (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Angesetzte Puffer und Lösungen:

- 1) 0,5 M Phosphatpufferstammlösung nach Sörensen
 KH_2PO_4 6,81 g auf 100 ml H_2O
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 44,5 g auf 500 ml H_2O
Unter pH-Kontrolle zusammen gießen bis pH 7,5 erreicht ist.
- 2) Daraus 0,05 M Phosphatpuffer durch Verdünnung 1:10
z.B. 100 ml von 1) auf 900 ml aqua bidestillata
- 3) 0,1 M Na-Veronalpuffer, pH 8,6
20,6 g Barbitol-Na auf 1000 ml H_2O
pH 8,6 einstellen mit 5 N HCl
- 4) 0,07 M Na-Veronal-Puffer
7 Volumina von 3) auf 3 Vol. H_2O
z.B. 350 ml von 3) + 150 ml H_2O
- 5) 5 %-Rinderalbumin-Veronalpuffergemisch zur Sättigung der
Sephadex-Säule
250 mg Rinderalbumin auf 5 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer
- 6) 1 %-Rinderalbumin-Phosphatpuffergemisch
300 mg Rinderalbumin auf 30 ml 0,05 M Phosphatpuffer

7) Chloramin T - Lösung

100 mg Chloramin T auf 20 ml 0,05 M Phosphatpuffer

Die Lösung wird erst kurz vor dem Gebrauch angesetzt und in einem lichtundurchlässigen Behälter im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt.

8) Natriumbisulfit-Lösung

4 mg Natriumbisulfit auf 2 ml 0,05 M Phosphatpuffer

9) Kaliumjodid-Lösung

50 mg KJ auf 5 ml 0,05 M Phosphatpuffer

10) Inkubationspuffer:

5 %-Rinderalbumin - 0,07 M Phosphatpuffer

1 g Rinderalbumin auf 20 ml 0,07 M Phosphatpuffer

Vorbereitung der Sephadex G 50-Säule:

- 1) 2,5 g Sephadex G 50 Fine in 150 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer einrühren und mindestens drei Stunden quellen lassen.
- 2) Säulenglasrohr (30 x 1 cm; mit Graduierung) reinigen, mit der Wasserstrahlpumpe trocknen und mit Äther vom Fett befreien. Nach dem Trocknen den Ausfluß des Rohres mit etwas Glaswatte abdichten und darauf eine Schicht Glasperlen geben. Die Abdichtung darf nicht zu fest sein, da sonst die Durchflußgeschwindigkeit der Säule zu gering wird.
- 3) Glasrohr lotrecht befestigen.
- 4) Glasrohr mit Na-Veronalpuffer vorspülen.
- 5) Gequollenes Gel eingießen und sich mindestens zwei Stunden absetzen lassen.
- 6) Darauf nachwaschen mit 10 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer.
- 7) Um die gleichmäßige Packung des Gels zu testen, gibt man Evans Blue, gelöst in Na-Veronalpuffer, auf die Säule. Läßt

sich der Farbstoff als eine schmale, horizontale Bande eluieren, so ist die Säulenpackung gleichmäßig.

- 8) Wenn die Oberfläche trocken ist, läßt man 1 ml der 5 %-Albumin-Pufferlösung einziehen, wäscht mit 20 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer nach und beläßt etwa 2 ml Überstand.
Dieses Absättigen der unspezifischen Proteinbindungsstellen des Sephadex-Gels erlaubt eine Wiederfinderate des markierten Proteohormons von 70-80 % (53).

2.1.2.3.0 Jodierung

In das konische Reagenzgefäß, das 0,05 ml trägerfreie ^{131}J -Lösung (2 mCi) enthält, werden nacheinander einpipettiert:

0,02 ml 0,05 M Phosphatpuffer

0,02 ml HGH-Lösung (4 µg)

0,02 ml Chloramin T-Lösung

Gemisch 45 Sekunden schütteln, dann zugeben:

0,1 ml Natriumbisulfit, zum Stoppen der Reaktion

0,2 ml Kaliumjodid, als Trägerjodid

Zwischen den einzelnen Schritten jeweils vorsichtig auf dem Vortex-Mixer mischen.

Dann wird das Reaktionsgemisch mit einer Glaskapillarpipette restlos auf die Sephadexsäule übertragen. Anschließend werden Reaktionsgefäß und Pipette mit 0,02 ml Kaliumjodidlösung gespült, das ebenfalls auf die Säule übertragen wird.

Eluiert wird mit 0,07 M Na-Veronalpuffer. Je 1 ml des Eluats wird in 30 Plastikröhrchen aufgefangen. In Röhrchen 4-30 werden vorher 1 ml Albumin-Phosphatpuffer gegeben. Die Radioaktivität eines jeden Röhrchens wird gemessen, wobei an allen Röhrchen mit mehr als 1 ml Inhalt eine Korrektur vorgenommen werden muß.

2.1.2.4.0 Berechnung der Spezifischen Aktivität

Im Unterschied zur Spezifischen Aktivität der Isotopen (siehe Kapitel 2.1.2.1.0) verstehen wir in diesem Fall unter der Spezifischen Aktivität die an das Hormonprotein gebundene Radioaktivität in Ci/g Hormonprotein.

Von der anfänglich gemessenen Gesamtaktivität des Reaktionsgefäßes subtrahiert man die Zählrate/Zeit der Restaktivität an Pipette und Reaktionsgefäß und erhält somit die Aktivität, die auf die Säule aufgetragen wurde. Dann ermittelt man die Zählrate/Zeit für alle 30 Proben des Eluats. Die Zählraten aller Proben, die mehr als 1 ml enthielten, mußten auf Grund der Geometrie des Zählgerätes mit einem Korrekturfaktor $1/577$ multipliziert werden. Dieser Korrekturfaktor war in Vorversuchen dankenswerterweise von Herrn Priv. Doz. Dr. A. Souvatzoglou ermittelt worden. Die graphische Darstellung des Eluats zeigt Abb. 1. Der erste Peak, der sogenannte Proteinpeak, enthält das markierte Proteohormon, in unserem Falle ^{131}J -HGH. Im zweiten Peak, dem sogenannten Salzpeak, ist vor allem radioaktives Natrium- und Kaliumjodid enthalten. Die Berechnung der Spezifischen Aktivität werden wir am Beispiel unserer Markierung durchführen.

Gesamtaktivität des ^{131}J	2 mCi
Eingesetzte HGH-Menge	4 µg
Reaktionsgemisch	85 443 (Zählrate/12sec) (= 100 %)
Glasgefäß und -pipette	8 647 (Zählrate/12sec) (= 10 %)
Säulenload	76 796 (Zählrate/12sec) (= 90 %)
Salzpeak	18 507 (Zählrate/12sec) (= 35 %)
Proteinpeak	34 704 (Zählrate/12sec) (= 65 %)
Gesamteluat	53 211 (Zählrate/12sec) (= 100 %)

Das Gesamteluat betrug 70 % des Säulenloads.

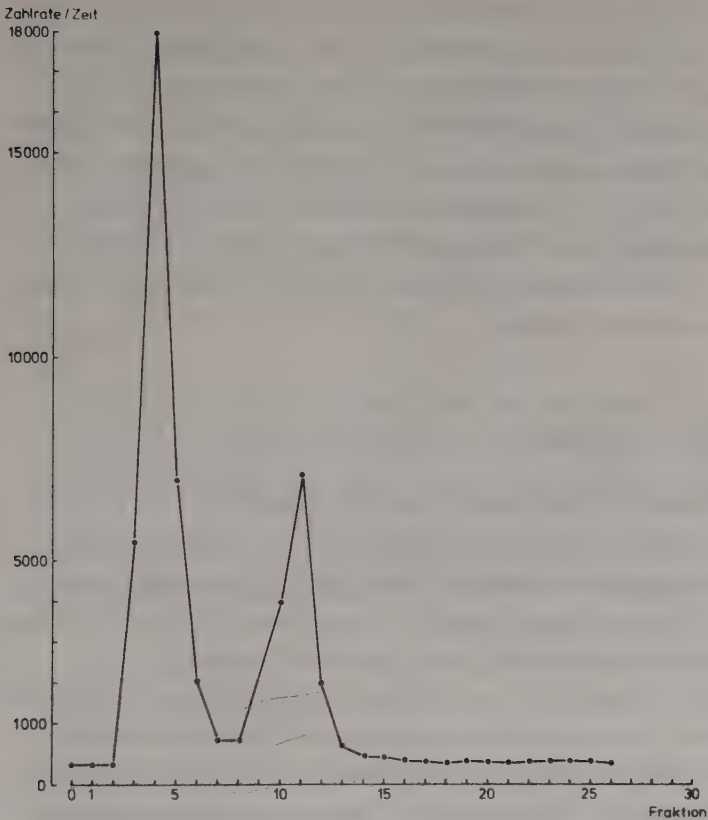


Abb. 1: Markierung des HGH mit ^{131}J . Eluat der G-50-Sephadex-Säule; Fraktion à 1,0 ml (weiteres siehe Text)

Säulenload - Salzpeak = markiertes Protein

$$76\,796 \text{ (C/12sec)} - 18\,507 \text{ (C/12sec)} = 58\,289 \text{ (C/12sec)}$$

76,5 % des Säulenloads sind markiertes Protein.

40 % des Proteins sind an die Sephadexsäule gebunden, d.h. 0,6 µg Protein/g Sephadex.

$$\text{Spezifische Aktivität } A = \frac{76,5 \times 2 \times 10}{4} = 384 \frac{\text{Ci}}{\text{g}}$$

Durch die radioaktive Markierung entstehen physikochemisch und damit auch immunologisch veränderte Hormonmoleküle ("damaged hormone"), deren Anteil an der Gesamthormonmenge wir durch den sogenannten "Paper Flow" zu ermitteln suchten. Diese Fraktionen aggregieren und werden unspezifisch an Serumproteine gebunden (58, 100, 111). Diese Methode wird im Kapitel 2.1.3 beschrieben. Man kann damit die reinste Fraktion des Proteinpeaks aussuchen und für die weiteren Versuche verwenden. Eine Nachreinigung führten wir nicht durch.

2.1.2.5.0 Zählgeräte

Zur Messung der Gammastrahlung der Jodisotopen ^{125}J und ^{131}J benützen wir zwei Bohrlochkristallszintillationszähler, nämlich den Reagenzglaswechsler FHT 770 D der Fa. Frieseke & Hoepfner GmbH, Erlangen-Bruck, und den Gamma/Guard 150 der Fa. Tracerlab. Dieses Gerät arbeitet nach folgendem Prinzip:

Durch die Gamma-Strahlung wird der NaJ-Kristall zur Szintillation angeregt. Diese Lichtblitze werden von der Photokathode des Photomultipliers in elektrische Impulse umgewandelt und nach Verstärkung als Counts/Zeit ausgedruckt. Da in einem definierten Energiebereich die Amplitude der Impulse des Szintillationszählers der Energie der auftreffenden Strahlung proportional ist, können ^{125}J und ^{131}J getrennt bestimmt werden.

Als optimale Einstellung für den FHT 770 D wurde gefunden:

Zur Messung von ^{125}J :	Eingangsempfindlichkeit 56 mV
	Kanalbreite 50 %
Zur Messung von ^{131}J :	Eingangsempfindlichkeit 62 mV
	Kanalbreite 50 %

Einstellung für den Tracerlab Gamma/Guard 150:

Zur Messung von ^{125}J :	High Voltage	460 V
------------------------------------	--------------	-------

Zur Messung von ¹³¹ J:	Threshold	35 mV
	Window	100 mV
	Coarse Gain	64
	Fine Gain	1,8
	High Voltage	460 V
	Threshold	80 mV
	Window	300 mV
	Coarse Gain	32
	Fine Gain	1,8

Eine wichtige Einstellgröße ist die Zählzeit. Dabei ist auf das Ausmaß des "statistischen Zählfehlers" zu achten, der definiert ist als:

$$F = \frac{1}{N} \cdot 100 \quad (N = \text{Zahl der Impulse/Zeit}).$$

Wir wählten die Zählrate stets größer als 1000 Impulse, was einen statistischen Zählfehler von kleiner als 3,1 % ergibt.

2.1.3.0.0 Hydrodynamic Flow

Durch den Oxidationsvorgang und die Jodsubstitution bei der Markierung sowie die radioaktive Strahlung des Isotops entstehen Degradationsprodukte des HGH (124b). Um nun den prozentualen Anteil dieses "damaged"-HGH zu erfassen, verwendeten wir die von YALOW und BERSON 1964 beschriebene Methode des "Buffer Flow" ("Hydrodynamic Flow", "Paper Flow"). Es handelt sich im Prinzip um eine Abwandlung der Papierchromatographie, wobei die treibende Kraft die Verdunstung des Laufmittels ist. Die Degradationsprodukte werden an Albumin gebunden und wandern, während das "intakte" Hormon an der Auftragsstelle adsorbiert bleibt (149a).

2.1.3.1.0 Methoden und Materialien

Unsere Modifikation der Methode: Als Laufmittel verwendeten wir

0,07 M Natriumbarbitalpuffer pH 8,6 - eisgekühlt. Jeweils ein Liter davon wurde in zwei gleichgroße Plastikbehälter gegeben, die 28 cm voneinander auf eine waagerechte Fläche gestellt wurden. Zwischen diese Behälter wurde nun ein mit Puffer befeuchteter 50 x 5 cm großer Streifen aus Watman Paper No. 4 gehängt. Die Enden tauchten 7 cm in Puffer ein. Das aufzutragende Gemisch besteht aus: 50 µl der ausgewählten Säulenfraktion der Markierung, 200 µl eines 5 %-Albumin-0,05 M-Phosphatpuffers pH 7,4 und einer Spur Bromphenolblau zur Anfärbung des Albumins. Davon werden nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 10 µl mit einer Elphopipette aufgetragen, jeweils 12 cm vom Streifenende entfernt. Die Laufzeit bei Raumtemperatur betrug annähernd 75 min. Der Trennvorgang wurde unterbrochen, wenn die beiden blau markierten Albuminfraktionen 5 cm voneinander entfernt waren. Nach dem Trocknen bei 120 °C wurde der Streifen in 1 cm lange Teile zerschnitten und im Gammazähler die Aktivität gemessen. Abb. 2 zeigt die graphische Darstellung der Aktivitätsverteilung entlang der Laufstrecke. Die Flächen über der X-Achse werden planimetriert und daraus der prozentuale "damage"-Anteil berechnet. (Mittelwert der zwei auf einem Streifen ausgeführten Trennungen).

2.1.3.2.0 Variation der Albuminkonzentration

Wir veränderten die Albuminkonzentration des Inkubationsgemisches von 1 g/l bis 50 g/l und sahen eine annähernde Konstanz des "damaged"-Anteils. Für die weiteren Versuche verwendeten wir eine Albuminkonzentration von 41 g/l.

2.1.3.3.0 "Alterung" des markierten HGH

Bewahrt man das markierte HGH tiefgefroren über längere Zeit auf, so nimmt die Strahlungsintensität mit dem physikalischen Zerfalls-

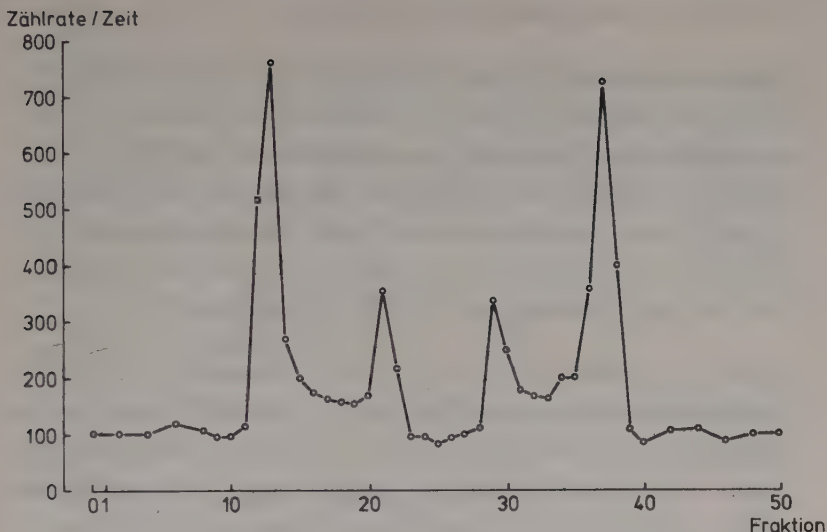


Abb. 2: Paperflow. Dargestellt ist die Aktivitätsverteilung entlang des Papierstreifens. Das damaged-Hormon wandert von beiden seitlichen Auftragsstellen des HGH zur Mitte (kleine Gipfel), während das intakte Hormon an die Auftragsstelle adsorbiert wird (große Gipfel).

gesetz ab und gleichzeitig ändern sich die physikochemischen und immunologischen Eigenschaften des markierten Hormons. Dabei ist das Ausmaß dieser Veränderungen von der Höhe der spezifischen Aktivität direkt abhängig (53). Um diesen radiochemischen "damage" zu erfassen, untersuchten wir dieselbe Charge am 17. 2. 1971 und am 15. 3. 1971 und fanden eine Zunahme von 25 % auf 37 %. An drei aufeinanderfolgenden Tagen konnte keine Änderung festgestellt werden. Das ebenfalls von uns untersuchte Luteinisierungshormon (LH) zeigt demgegenüber eine Änderung von 13 % innerhalb 7 Tagen.

2.1.3.4.0 Aussagewert für die Markierung

Untersuchungen mit LH (gemeinsam mit Dr. Souvatzoglou) (135a) zeigten an 20 Markierungen keine eindeutige Korrelation zwischen immunologischer Reaktivität, spezifischer Aktivität und damaged bzw. intaktem Anteil des markierten LH. Als Maß für die immunologische Reaktivität wurde die sogenannte Überschußbindung verwendet, d.h. derjenige Teil des gesamten zugesetzten Tracers, der bei einem Überschuß des Antikörpers gebunden wurde.

Weder war die Korrelation des intakten Hormonanteils mit der Überschußbindung signifikant ($r = -0,3994$; $N = 20$), noch die des damage-Anteils mit der Überschußbindung ($r = 0,3994$; $N = 20$). Genausowenig war die Korrelation der spezifischen Aktivität mit dem damage-Anteil ($r = 0,3298$; $N = 17$) und die spezifische Aktivität mit der Überschußbindung ($r = 0,3095$; $N = 20$) signifikant.

Diese Befunde stimmen mit den Angaben von GREENWOOD und HUNTER (53) überein, die keine Änderung der immunologischen Reaktivität in einem großen Bereich der spezifischen Aktivität fanden.

Mittelwerte und Standardabweichungen von spezifischer Aktivität, Überschußbindung und "Paper Flow"-Fraktionen:

Überschußbindung	$86,5 \pm 4,3$ (%)
Spezifische Aktivität	185 ± 62 (mCi/mg)
"damaged" Hormon	$18,6 \pm 8,7$ (%)
"intact" Hormon	$81,4 \pm 8,7$ (%)

2.1.4.0.0 HGH-Radioimmunoassay

Im Folgenden werden verschiedene Verfahren für die Trennung des antikörpergebundenen vom freien HGH dargestellt.

2.1.4.1.0 Natriumsulfat-Präzipitationsmethode

Bei dieser Methode nach GRODSKY und FORSHAM (55a) erfolgt die Trennung des freien Hormons vom antikörpergebundenen Hormon durch die Ausfällung des gebundenen Anteils mit Natriumsulfatlösung. Als Trägerprotein für die Präzipitation dienen Rinderserum oder menschliches Gammaglobulin.

2.1.4.1.1 Reagenzien

- a) Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst (Behringwerke AG, ORHD)
- b) Gamma-Globulin (Behringwerke)
- c) 0,05 M Phosphatpuffer, 10 g/l Rinder-Albumin, pH 7,4
- d) Na_2SO_4
- e) Anti-Human-Growth-Hormon-Serum von der Ziege
(Mann Research Laboratories N. Y., N. Y., Kat. Nr.: 1435)
verdünnt mit 5 %-Albumin-Phosphatpuffer
- f) HGH- ^{131}J aus obiger Markierung (Fraktion Nr. 6);
HGH- ^{125}J , spezifische Aktivität 167 mCi/mg;
9 ng/Glas, gefriergetrocknet
(Società Ricerche Impianti Nucleari, Saluggia, Italien).

2.1.4.1.2 Verschiedene Salzkonzentrationen

Zunächst werden 0,5 ml Antiserum (Stammlösung verdünnt mit 0,5 %-Albumin-Phosphatpuffer 1 : 20 000) mit 0,2 ml HGH- ^{131}J (Stammlösung verdünnt mit 1 %-Albumin-Phosphatpuffer 1 : 200) für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. (Günstigste Inkubationszeit und -temperatur in Vorversuchen ermittelt.) Darauf werden 0,2 ml einer Gammaglobulinlösung mit 5 mg/ml in 0,05 M Phosphatpuf-

fer pH 7,4 zugegeben, gemischt; dann 2 ml der heiß gelösten Na_2SO_4 -Lösung verschiedener Konzentrationen zugegeben, gemischt und 30 Minuten im Wasserbad bei 27°C inkubiert. Anschließend wird bei 1500 g zentrifugiert, 1 ml des Überstandes mit der 1 ml-Eppendorf-Mikropipette abgenommen und im Gammazähler gemessen. Das Carrier-Gamma-Globulin wurde später ersetzt durch Rinderserum, das im selben Verhältnis wie die Serummeßprobe verdünnt wurde.

Als Kopräzipitation bezeichnet man die bereits ohne Antikörper präzipitierte Radioaktivität. Das Bestreben ist, die Kopräzipitation so klein als möglich zu halten und dennoch die ganze "bound"-Fraktion auszufällen. Das Ergebnis zeigt Abb. 3. Endgültig verwendet wurde eine heiß gelöste 22 % Natriumsulfatlösung, die eine Salzendkonzentration des Reaktionsgemisches von 15,5 g% ergab.

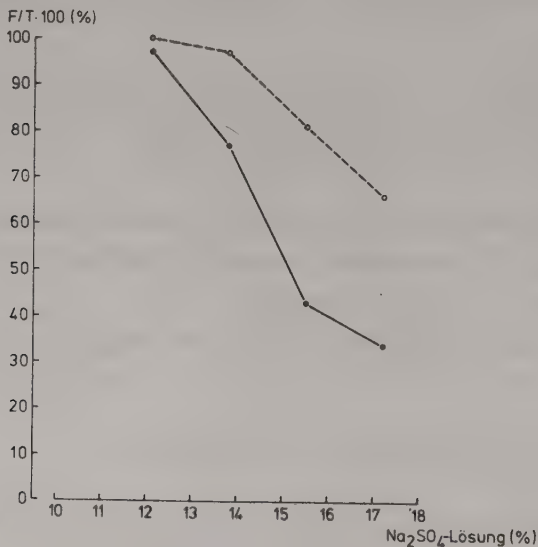


Abb. 3:

Trennung von antikörpergebundenem und freiem HGH durch Salzfällung mit Na_2SO_4 -Lösungen verschiedener Konzentration. Gemessen wurde der freie Hormonanteil und dann auf die Gesamtmenge T des HGH-J¹³¹ bezogen.

- — ● HGH-J¹³¹ mit Antikörperzusatz
- - - - ○ HGH-J¹³¹ ohne HGH-Antikörperzusatz

2.1.4.1.3 Titration des Anti-HGH-Antiserums

Nach YALOW und BERSON (9) ist die Sensitivität eines radioimmunologischen Systems am größten, wenn das Antiserum so verdünnt ist, daß es in der Abwesenheit von unmarkiertem Hormon 50 - 70 % des markierten bindet. Wir erstellten nun eine Antikörperverdünnungskurve mit fallenden Titern von 1 : 500 bis 1 : 10⁶. Daraus ergab sich, daß 50 % des markierten HGH von dem 1 : 50 000 verdünnten Antikörper gebunden werden.

Versuchsansatz:

0,1 ml Rinderserum (1 : 6 verdünnt mit 0,5 %-Albumin-Phosphatpuffer)

0,2 ml Antikörper (1 : 500 bis 1 : 10⁶)

0,1 ml HGH-¹²⁵J

1,0 ml Na₂SO₄ 22 % (heiß gelöst)

1 ml des Überstandes im Gammazähler gemessen.

2.1.4.1.4 Serummeßwerte

Der "within assay"-Variationskoeffizient wurde bestimmt und eine Korrelation der Werte zur Doppelantikörpermethode versucht. Das endgültig verwendete Verfahren der Trennung mit Hilfe der Salzpräzipitation: 0,1 ml des Patientenserums (1 : 6 bzw. höher verdünnt mit dem oben beschriebenen Phosphatpuffer, 0,05 M mit 0,5 % Albumin) bzw. 0,1 ml HGH-Standardlösung (1 bzw. 2,5 bzw. 5 bzw. 10 bzw. 20 ng lyophilisiertes HGH im ml Rinderserum, das 1 : 6 mit Phosphatpuffer verdünnt war) wurde für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert mit 0,2 ml HGH-Antikörper von der Ziege (1 : 50 000 verdünnt mit Phosphatpuffer). Darauf wurden 0,1 ml HGH-¹²⁵J (1 ng/ml lyophilisiertes HGH mit einer spezifischen Aktivität von 167 mCi/mg, gelöst in verdünntem Rinderserum) zugesetzt und weitere 24 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Proben in ein Wasserbad von 28°C gestellt und 1 ml der im Wasserbad auf 28°C gehaltenen, heiß gelösten 22 % Natriumsulfatlösung zugegeben. Die Proben wurden 15 Minuten im Wasserbad geschüttelt und anschließend mit einer Tischzentrifuge bei 1500 g 15 Minuten lang zentrifugiert. Vom Überstand wurden mit der Eppendorf-Mikropipette 1 ml vorsichtig abgenommen, in Eppendorfgläser gegeben und im Gammazähler die Zählrate bestimmt. Die Zählzeit wurde jeweils so gewählt, daß die niedrigste Zählrate über 2500 Counts lag, was einem statistischen Fehler von < 2 % entspricht. Es wurden immer Dreifachwerte bestimmt. Die Einteilung der Proben ergibt sich aus folgendem Schema:

Tabelle 1: Verteilungsschema der Probentriplets:

	HGH- 125J	HGH- Antikör- per (Ziege)	Albumin- Phosphat- puffer	Stan- dard	Human- serum	Rinder- serum
1) T:	0,1 ml	-	-	-	-	0,3 ml
2) N:	0,1 ml	-	0,2 ml	-	-	0,1 ml
3) B ₀ :	0,1 ml	0,2 ml	-	-	-	0,1 ml
4) S:	0,1 ml	0,2 ml	-	0,1 ml	-	-
5) P:	0,1 ml	0,2 ml	-	-	0,1 ml	-

<u>Erklärung:</u>	T	=	Gesamtaktivität
	N	=	Kopräzipitation
	B ₀	=	Leerwert
	S	=	Standardkurve
	P	=	Serumproben

Probengruppe 2) bis 5) werden mit 1 ml Natriumsulfatlösung versetzt.

Qualitätskontrolle:

1) Kopräzipitation: ohne Serum 15 - 20 %, mit Serum bis 40 % der Gesamtaktivität

2) Spezifität des Antikörpers siehe Abschnitt 2.1.4.2.5

3) Sensitivität: Definiert als niedrigste eindeutig zu bestimmende Serumkonzentration (x). Aus der Standardkurve ergibt sich

$$y = \frac{B_o - 3s}{T} (\%) \quad (T = \text{Gesamtaktivität des Tracers})$$

Für die Salzpräzipitationsmethode gilt:

$$x = 0,5 \text{ ng/ml}$$

4) Präzision: Die Präzision einer Methode beschreibt man durch den Variationskoeffizienten innerhalb eines Testes (= "within assay"-Variationskoeffizient) und zwischen verschiedenen Testen (= "between assay"-Variationskoeffizient) (124a). Der Variationskoeffizient ist definiert als der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert.

Für unsere Methode fanden wir ("within assay"-VK):

a) im Bereich niedriger Konzentrationen:

$$\bar{x} = 1,2 \text{ (ng/ml)}, \quad \text{VK} = 44 \% \text{ (N} = 18\text{)}$$

b) im mittleren Bereich:

$$\bar{x} = 2,8 \text{ (ng/ml)}, \quad \text{VK} = 32 \% \text{ (N} = 7\text{)}$$

5) Eine Korrelation der Serummeßwerte mit der Doppelantikörpermethode konnte wegen der geringen Zahl nicht durchgeführt werden.

2.1.4.2.0 Dextran-coated Charcoal Radioimmunoassay

2.1.4.2.1 Prinzip

Von HERBERT et al. (63) wurde 1965 ein neues Prinzip zur Trennung von "Bound" und "Free" eingeführt: die Dextran-beschichtete Holzkohle, welche das freie, d.h. nicht antikörpergebundene Hormon adsorbiert. Die Kohle wird dann durch Zentrifugation abgetrennt.

2.1.4.2.2 Reagenzien und Materialien

- 1) Zunächst verwendeten wir Aktivkohle (Reagenzien Merck Nr. 2184), gingen aber nach einigen Vorversuchen auf Norit A (Serva, Heidelberg, Kat.Nr. 30 890) über (Partikeldurchmesser 4-5 μ , wasserlösliche Anteile 0,05 %).
- 2) Dextran T 70, MG = 63 000 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- 3) Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7,5, 0,05 M, beschrieben unter 2.1.2.1.0
- 4) Serumalbumin vom Rind trocken, reinst (Behringwerke)
- 5) Humanalbumin trocken, reinst (Behringwerke RHA 04)
- 6) Rinderserum, verdünnt mit Phosphatpuffer
- 7) Humanserum (hypophysektomierte Patientin, kein nachweisbares HGH)
- 8) HGH-¹²⁵J, gefriergetrocknet, spezifische Aktivität 167 mCi/mg; wird gelöst in 5 ml Phosphatpuffer pH 7,5, 0,05 M, mit 5 g Rinderalbumin/Liter und ergibt eine HGH-Konzentration von 20 ng/ml.
- 9) HGH-Standard (Wilhelmi-Präparation, S.O.R.I.N.), gefriergetrocknet, wird gelöst in mit Phosphatpuffer verdünntem Rinderserum bzw. Humanserum.
- 10) Anti-Human-Growth-Hormone-Serum (Ziege)

2.1.4.2.3 Herstellung des Adsorbens

Zunächst wurden steigende Mengen Charcoal Norit A mit und ohne Dextran T 70 - Zusatz untersucht auf ihr Adsorptions- und Diskriminationsvermögen hinsichtlich freiem und antikörpergebundenem HGH. Das abgewogene Kohlepulver wird vorsichtig mit 50 ml Phosphatpuffer suspendiert, der 5 g Albumin/l enthält. Weiter werden jeweils 250 mg Dextran T 70 mit 50 ml dieses Puffers versetzt und

die homogene Suspension wird mit der Charcoal-Lösung gemischt. Die Adsorbenssuspension wird kurz vor dem Gebrauch angesetzt. Vorversuche zeigten, daß der Alterung der Lösung große Bedeutung zukommt. So nahm die Adsorption des freien Hormons von 89 % auf 38 % ab, wenn man die Suspension 7 Tage bei 4 °C und Merthiolatzusatz (0,01 %) aufbewahrte.

Der zu trennende Inkubationsansatz war 24 Stunden bei 4 °C inkubiert worden und setzt sich wie folgt zusammen:

- 1) 0,1 ml Tracer (= HGH-¹²⁵J)
- 2) 0,2 ml Antikörper, 1 : 50 000 verdünnt mit 0,5 %-Albumin-0,05 M Phosphatpuffer
- 3) 0,1 ml Phosphatpuffer pH 7,5, 0,05 M, mit 5 g Rinderalbumin/Liter. Die Reaktionsgefäße wurden in Eiswasser gestellt, um konstante Temperatur zu gewährleisten, und in jedes Röhrchen mit der Eppendorf-Mikropipette 1 ml der Charcoalsuspension mit oder ohne Dextran T 70 gegeben. Jedes Röhrchen wird gerüttelt und etwa 5 min im Eiswasser stehengelassen. Diese Zeit ist zur endgültigen Absorption ausreichend.

Die Kohlesuspension steht in Eiswasser auf einem Magnetrührer. Es muß darauf geachtet werden, daß Drehgeschwindigkeit des Magnetkerns, Entnahmestelle und Füllungszustand des Gefäßes annähernd konstant sind. Das Ergebnis dieses Versuches zeigt Abb. 4. Daraus entnehmen wir folgende Bedingungen für die Charcoalsuspension: 500 mg Norit A und 250 mg Dextran T 70 auf 100 ml Albumin-Phosphatpuffer. Eine Änderung der Dextran T 70 - Konzentration von 50 mg/100 ml auf 500 mg/100 ml erbrachte keine signifikante Steigerung der Absorption. Eine wesentliche Verbesserung erbrachte folgendes Vorgehen: Charcoal Norit A und Dextran T 70 werden in proteinfreiem Phosphatpuffer suspendiert und kurz vor der Zugabe des Adsorbens 0,1 ml einer eisgekühlten 0,5 %-Albumin-Pufferlösung in die Reaktionsgefäße pipettiert. Bei diesem Versuch zeigte

sich auch, daß Humanalbumin ungünstiger ist als Rinderalbumin.

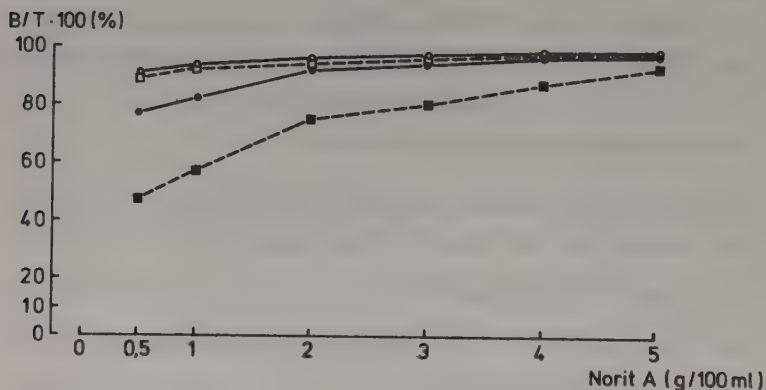


Abb. 4: Effekt der Dextranbeschichtung der Charcoal:
Gemessen wurde der gebundene Anteil des gesamten HGH-¹²⁵J (= T).

- — ○ Norit A - Charcoal-Lösung
- — ● Norit A - Charcoal-Lösung mit HGH-Antikörperzusatz
- --- □ Norit A - Charcoal-Lösung mit 250 mg Dextran T 70/100 ml
- --- ■ Norit A - Charcoal-Lösung mit 250 mg Dextran T 70/100 ml mit HGH-Antikörperzusatz

2.1.4.2.4 Titration des Antikörpers

0,2 ml Antikörperlösung (Ziege) mit steigender Verdünnung von $1 : 10^3$ bis $1 : 10^6$ wurden 40 Stunden bei 4°C mit 0,1 ml HGH-¹²⁵J und 0,1 ml Rinderserum ($1 : 6$ verdünnt) bzw. mit 0,1 ml HGH-freiem Humanserum ($1 : 6$ verdünnt) inkubiert. Zwischen Human- und Rinderserum bestand kein Unterschied. Vom Antikörper in einer Verdünnung $1 : 50\,000$ wurden in diesem System 55 % des markierten Hormons gebunden.

2.1.4.2.5 Spezifität des HGH-Antikörpers (Ziege)

Spezifität des Antikörpers bedeutet in unserem Fall seine Fähigkeit HGH selektiv zu binden. Andere Proteohormone können auf Grund ihrer Strukturähnlichkeit (70) mehr oder minder mit dem Antikörper kreuzreagieren. Wir testeten das Selektionsvermögen unseres Antikörpers bezüglich LH, TSH und HCS. Die Kreuzreaktivität des Antikörpers ist Abb. 5 zu entnehmen.

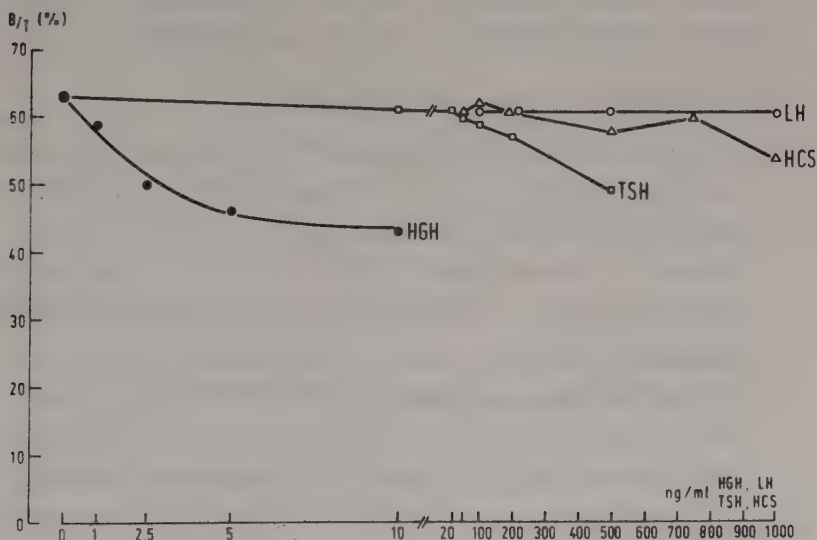


Abb. 5: Kreuzreaktion von TSH, LH und HCS mit dem HGH-Antikörper (Ziege)

Luteinisierendes Hormon (LH), ein Glykoproteidhormon (MG 30 000) weist keine Kreuzreaktion mit unserem Antikörper auf. 500 ng/ml des Glykoproteidhormons TSH (MG = 25 000) verdrängen ebensoviel HGH-¹²⁵J aus der Antikörper-Bindung wie 3,3 ng HGH/ml (siehe Diskussion). Für HCS liegt die Relation bei 1000 : 1,8.

2.1.4.2.6 Vorinkubation, Inkubationszeit und Inkubations- temperatur

Zur Verbesserung der Präzision des Testes, was sich graphisch in einer steileren Eichkurve manifestiert, wurden von HALES und RANDLE (60) für die Doppelantikörpermethode die "disequilibration technique" und von KEANE et al. (73) für die Dextran-coated-Charcoalmethode das Prinzip der "late addition" eingeführt. Dies bedeutet, daß der Tracer erst nach einer Vorinkubation des Antikörpers mit dem unmarkierten Hormon zugesetzt wird.

Wir verwendeten folgenden Versuchsansatz:

- 1) Vorinkubation von 0,2 ml Antikörper (1 : 50 000) mit 0,1 ml HGH-Standardverdünnung (von 1,0 - 20,0 ng/ml) bzw. 0,1 ml Rinderserum (1 : 6 verdünnt) bzw. Patientenserum (1 : 6) für 12 Stunden bei 4 °C. Darauf Zugabe von 0,1 ml HGH-¹²⁵J (1 ng/ml) für 24 Stunden bei 4 °C. Trennvorgang mit 1 ml Charcoal-Suspension.
- 2) Gleichzeitige Inkubation von 0,2 ml Antikörper (1 : 50 000) mit 0,1 ml HGH-Standardverdünnung (1; 2,5; 5; 10 und 20 ng/ml) bzw. 0,1 ml Rinderserum (1 : 6 verdünnt) bzw. Patientenserum (1 : 6 verdünnt) und 0,1 ml HGH-¹²⁵J-Lösung für 36 Stunden bei 4 °C. Trennverfahren für "bound" und "free" mit 1 ml Charcoal-Suspension.
- 3) Vorinkubation mit dem Tracer: 0,1 ml HGH-¹²⁵J-Lösung für 12 Stunden bei 4 °C. Dann zusätzliche Inkubation mit Standard bzw. Serum für 24 Stunden bei 4 °C. Trennung und Messung der Aktivität von 1 ml Überstand.

Wie aus Abb. 6 zu entnehmen ist, bietet die "late addition" einen wesentlichen Vorteil gegenüber der gleichzeitigen Inkubation, während die Vorinkubation mit dem Tracer sehr ungünstig ist.

Die von uns ermittelten günstigsten Inkubationsbedingungen ergaben folgendes Inkubationsschema: 12 Stunden Vorinkubation bei 4 °C, ge-

folgt von 24 Stunden Tracerinkubation bei 4 °C.

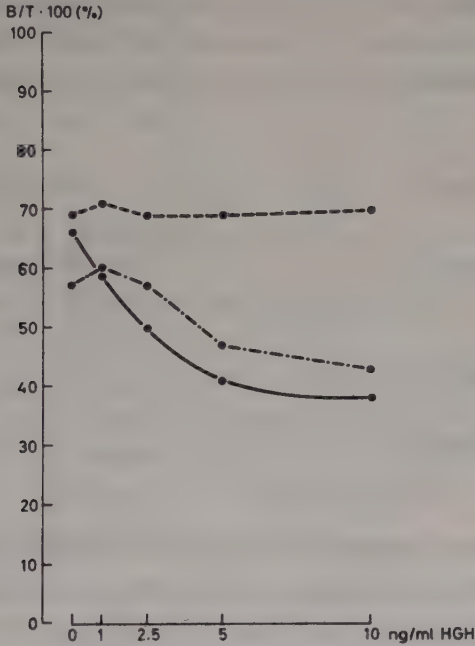


Abb. 6: Vorinkubation bei der Charcoalmethode. Dargestellt sind die Eichkurven mit Zugabe des Tracers HGH-¹²⁵J 12 Stunden nach (●—●), gleichzeitig mit (●- - ●) und 12 Stunden vor (●---●) der Inkubation des Standard-HGH mit dem HGH-Antikörper

2.1.4.2.7 Präzision und Sensitivität

Als Maß für die Präzision dieser Methode verwendeten wir den Variationskoeffizient, d. h. den Quotienten aus Standardabweichung und arithmetischem Mittel ($\bar{x}$).

Ergebnis:

$$\begin{aligned} 1) \quad \bar{x} &= 3,1 \text{ (ng/ml)} \\ N &= 5 \\ s &= \pm 0,1 \text{ (ng/ml)} \\ VK &= 3 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2) \quad \bar{x} &= 8,0 \text{ (ng/ml)} \\ N &= 19 \\ s &= \pm 0,8 \text{ (ng/ml)} \\ VK &= 10 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 3) \quad \bar{x} &= 9,12 \text{ (ng/ml)} \\ N &= 5 \\ s &= 0,88 \text{ (ng/ml)} \\ VK &= 9,6 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 4) \quad \bar{x} &= 29,6 \text{ (ng/ml)} \\ N &= 18 \\ s &= 10,7 \text{ (ng/ml)} \\ VK &= 36 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 5) \quad \bar{x} &= 38,4 \text{ (ng/ml)} \\ N &= 13 \\ s &= 12,6 \text{ (ng/ml)} \\ VK &= 33 \% \end{aligned}$$

Diese Patientenserumproben wurden bestimmt in einer Verdünnung mit Phosphatpuffer von 1 : 6. Damit ergibt sich für den Standardkurvenabschnitt 5 ng/ml ein Variationskoeffizient (VK) von 3 % - 10 % und für den Abschnitt bis 10 ng/ml ein VK von 33 % - 36 %, was durch den flachen Verlauf der Standardkurve erklärt ist.

Unter Sensitivität verstehen wir diejenige geringste Serumkonzentration, welche mit dieser Methode gerade noch statistisch signifikant (2.1.4.1.4) erfaßt werden kann. Sie betrug 0,4 ng/ml.

2.1.4.3.0 Solid Phase - Methode

1967 wurde von CATT und TREGGAR eine neue Methode zur Trennung von "bound" und "free" Hormon eingeführt (22, 23). Im Prinzip beschrieben LEININGER et al. (88) 1966, daß Kunststoffe, z.B. Polystyrene, an ihrer Oberfläche 7-S-Gamma-Globuline physikalisch zu binden vermögen. Man wendet dieses Prinzip auf den Radioimmunoassay wie folgt an: Polystyren-Röhrchen werden durch

Inkubation mit der Antikörperlösung an der Innenwand mit einer monomolekularen HGH-Antikörperschicht versehen. In dieses Röhrchen werden gleichzeitig HGH-¹²⁵J und Standard oder Serum pipettiert. Nach der Inkubation wird der Röhrcheninhalt abgesaugt und die Aktivität des Röhrchens im Gamma-Zähler gemessen ("bound").

2.1.4.3.1 Materialien und Methoden

Das HGH-¹²⁵J Imusay Kit (Abbott Laboratories, North Chicago/Ill. No. 7764) enthält:

12 ml HGH-¹²⁵J (12 µCi) (No. 7758) (2 I. E. /mg)

100 antikörperbeschichtete Polystyrenröhrchen

10 ml HGH-Standard (8 ng/ml NPA (Dr. Wilhelmi) HS 1216-C)

60 ml Pferdeserum in Phosphatpuffer gelöst

40 ml Phosphatpuffer (No. 8320)

Zunächst wurden die Röhrchen beschriftet und für jede Probe Dreifachwerte erstellt. Als erstes werden die Standardverdünnungen in Plastikröhrchen ausgeführt. 7 Stück werden wie folgt beschriftet: 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,2 und 0 ng/ml. In jedes dieser Röhrchen, außer dem mit 40 gekennzeichneten, werden 2 ml des verdünnten Pferdeserums einpipettiert. Dann werden in die Röhrchen mit der Beschriftung 40 und 20 ng/ml je 2 ml der Standardlösung (8 ng/ml) gegeben, das letztere gemischt, ohne zu schäumen, und daraus 2 ml entnommen und in das Röhrchen mit 10 ng/ml gegeben. Diese 1:2-Verdünnung wird so fortgesetzt bis zu Röhrchen mit 1,2 ng/ml. In Röhrchen 0 ist nur Pferdeserum enthalten. 0,5 ml aus jedem Röhrchen werden nun in die Triplets der beschichteten Reagenzgefäße pipettiert. Als nächstes werden die Serumproben direkt in die beschichteten Röhrchen gegeben. Ist eine HGH-Konzentration kleiner als 40 ng/ml zu erwarten, so gibt man 0,1 ml des Serums und 0,4 ml des Phosphatpuffers in jeweils ein beschichtetes Röhrchen. Auch

von jeder Serumprobe werden Dreifachwerte erstellt. Die Konzentrationen können direkt aus der Standardkurve abgelesen werden. Sind Serumkonzentrationen über 40 ng/ml zu erwarten, so wird das Serum zunächst noch mit Phosphatpuffer 1 : 5 verdünnt und 0,1 ml dieses verdünnten Serums in das beschichtete Reaktionsgefäß zu den 0,4 ml Phosphatpuffer pipettiert. Die aus der oben erstellten Standardkurve abgelesenen Konzentrationen müssen dann noch mit dem Faktor 5 multipliziert werden, um die wahre Serum-HGH-Konzentration zu erhalten. In jedes beschichtete Röhrchen werden nun 0,1 ml der HGH-¹²⁵J-Lösung gegeben. Nach vorsichtigem Mischen erfolgt die Inkubation bei 37 °C (22). Nach vollendeter Inkubation wird der Röhrcheninhalt mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, mit 7 ml aqua bidestillata gespült und die Tropfen vorsichtig von der Wand abgesaugt. Zerkratzen der Wand soll man vermeiden. Anschließend können die Röhrchen direkt im Gamma-zähler gemessen werden.

2.1.4.3.2 Inkubationszeit

Eine gute Möglichkeit, die Sensitivität und Präzision einer Eichkurve zu verbessern, besteht darin, die Inkubationszeit in gewissen Grenzen zu erhöhen (22). Wir verglichen eine Inkubationszeit von 48 Stunden mit einer Inkubationszeit von 72 Stunden, jeweils bei 37 °C. So betrug im ersten Fall der Abfall der Tracerbindung von 0 auf 40 ng/ml 28 %, während sich dieser bei 72-stündiger Inkubation auf 42 % erhöhte. Damit erhöhten sich Sensitivität und Präzision der Kurve wesentlich. Abb. 7 zeigt den Vergleich beider Standardkurven.

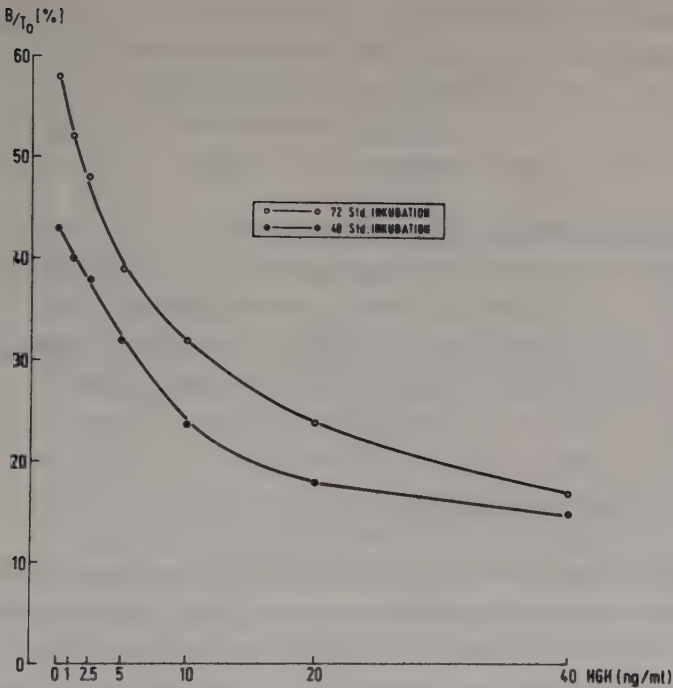


Abb. 7: Verschiedene Inkubationszeiten bei der HGH-Solid phase-Methode

2.1.4.3.3 "Within assay"-Variationskoeffizient

Wir bestimmten die Abweichung der Meßwerte eines Serums im Bereich kleiner und im Bereich größer als 10 ng/ml. Der Mittelwert der Gesamtaktivität (T) wurde bestimmt aus der Aktivität von 30 Röhrchen, gemessen vor dem Absaugen.

Mittelwert der
Gesamtaktivität

$\bar{x}$: 26 699,3 (Zählrate/2 min)

s: 186,5 (Zählrate/2 min)

VK: 0,7 %

1) Variation der B/T-Werte

a) Mittelwert $\bar{x}$	= 20,6 (%)	b) $\bar{x}$	= 40,0 (%)
N	= 24	N	= 44
s	= 2,6 (%)	s	= 3,7 (%)
VK	= 12,4 %	VK	= 9,1 %

2) Variation der Serumkonzentrationen

a) $\bar{x}$	= 14,52 (ng/ml)	b) $\bar{x}$	= 5,19 (ng/ml)
N	= 24	N	= 44
s	= 1,0 (ng/ml)	s	= 2,72 (ng/ml)
VK	= 18 %	VK	= 19 %

2.1.4.4.0 Doppelantikörpermethode

1962 entwickelten MORGAN und LAZAROW (105) die Doppelantikörpermethode zur selektiven Entfernung des "bound"-Anteils aus dem Reaktionsgemisch. Dabei erfolgt die Trennung von "bound" und "free" durch die Präzipitation von "bound" mittels eines spezifischen Antiserums (= 2. Antikörper). Wir verwendeten den HGH-Kit der S.O.R.I.N.

2.1.4.4.1 Reagenzien und Methode

Boratpuffer 0,13 M, pH 8,4 mit 0,5 g% Rinderalbumin als Lösungsmittel für den lyophilisierten Antikörper, den Tracer und den Standard, sowie zur Verdünnung der Serumproben.

Ansatz:	Borsäure (kristall., MG 61,83)	
	(Reagenzien Merck, Nr. 165)	8,00 g
	Äthylendinitrilotetraessigsäure-	
	Dinatriumsalz (Dihydrat), Triplex III	
	(MG 372,24)	
	(Merck Reagenzien Nr. 8418)	7,46 g

Rinderalbumin, trocken, reinst

(Behringwerke AG)

5,00 g

Mit 2 N Natronlauge wird das pH auf
8,4 eingestellt.

Auffüllen mit aqua bidestillata auf 1 Liter.

Um ähnliche Proteinverhältnisse in den Standardlösungen und den Serumproben zu erhalten, wurde der lyophilisierte Standard mit einem Rindermischserum gelöst und weiter verdünnt, das mit dem oben beschriebenen Boratpuffer im Verhältnis 1 : 6 verdünnt war. Der lyophilisierte HGH-Antikörper (Meerschweinchen) wird in 8 ml Boratpuffer gelöst. Die Verdünnung ist so gewählt, daß etwa 40 - 60 % des Tracers gebunden werden. Der ebenfalls lyophilisierte präzipitierende Antikörper (= 2. Antikörper, vom Kaninchen) wird gleichfalls in 8 ml Boratpuffer gelöst. Das lyophilisierte, mit ¹²⁵J markierte HGH (spezifische Aktivität 167 mCi/mg) wird in 9 ml Boratpuffer gelöst, was eine HGH-Konzentration von 1 ng/ml ergibt. Die Markierung erfolgte elektrolytisch nach der Methode von U. ROSA (124b).

Herstellung der Standardlösungen:

100 ng HGH werden in 5 ml des verdünnten Rinderserums gelöst und ergeben die höchste Konzentration der Eichkurve: 20 ng/ml. Durch fortgesetzte Verdünnung mit der Rinderserumlösung werden die übrigen Konzentrationen erstellt: 10, 5, 2,5 und 1 ng/ml HGH.

Die Serumproben werden in der Regel mit Boratpuffer im Verhältnis 1 : 6 verdünnt. Sind sehr hohe HGH-Serumkonzentrationen zu erwarten, wie zum Beispiel bei der Akromegalie, erfordert dies eine höhere Verdünnung. Von jeder Einzelprobe werden Dreifachwerte erstellt. Jeder Ansatz ergibt maximal 160 Einzelwerte. Die Aufteilung der Einzelproben ergibt sich aus Tabelle 2.

Tab. 2: Verteilungsschema der Probenriplets bei der Doppelantikörpermethode

	HGH- 125J	HGH	Borat- puffer	Rinder- serum	Patienten- serum	1.AK	2.AK
T:	0,1 ml	-	-	-	-	-	-
N:	0,1 ml	-	0,1 ml	0,1 ml	-	-	0,1 ml
B _o :	0,1 ml	-	-	0,1 ml	-	0,1 ml	0,1 ml
S:	0,1 ml	0,1 ml	-	-	-	0,1 ml	0,1 ml
P:	0,1 ml	-	-	-	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

Erklärung:

T	=	Gesamtaktivität
N	=	unspezifische Bindung
B _o	=	Leerwert
S	=	Standardkurve
P	=	Serumproben

Die Reaktion wird in Eppendorf-Kunststoffgefäßen ausgeführt.

Zunächst erfolgt eine Vorinkubation des HGH-bindenden 1. Antikörpers mit dem Standard- bzw. Rinderserum bzw. der Serumprobe für 6 Stunden bei 37 °C im Inkubator. Darauf wird ¹²⁵J-HGH zugegeben und weitere 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die folgende Präzipitation mit dem 2. Antikörper wird bei 4 °C durchgeführt und dauert 24 Stunden. Beim Mischen der Reaktionspartner ist darauf zu achten, daß das Gemisch nicht schäumt und der Deckel nicht benetzt wird. Anschließend folgt die Abtrennung des Präzipitats ("bound"-Hormon) durch Mikrofiltration über Zelluloseazetatfilter nach BOTTERMANN et al. (12).

2.1.4.4.2 Einfluß der Hämolyse auf den HGH-Radioimmunoassay

Im Gegensatz zur Solid Phase-Methode (22) beeinflusst die Hämolyse die Doppelantikörpermethode (149a). Um den Einfluß der Hämolyse

auf die HGH-Bestimmung quantitativ zu erfassen, teilten wir das Blut einer akromegalen Patientin nach Entnahme in 6 gleichgroße Volumina auf. Volumen 1 wurde wie üblich unter dem Zusatz von Asal-Z-Kunststoffperlen in einer ungekühlten Tischzentrifuge bei 1500 g zentrifugiert, und das Serum anschließend vorsichtig dekantiert. In den Volumina 2 bis 6 wurde durch Rühren und verschärftes Zentrifugieren bis zu 5700 g eine gradmäßig ansteigende Hämolyse erzeugt. Die quantitative Bestimmung des Hämolysegrades erfolgte photometrisch. Zunächst wurde das Serum im Verhältnis 1 : 6 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und im Eppendorphotometer bei 366 nm die Extinktion gemessen (Mikroküvette mit $d = 1$ cm; 1×4 - Spalt). Geeicht wurde das Photometer mit aqua bidest. und der Leerwert = physiolog. Kochsalzlösung von jeder Probenextinktion subtrahiert. Abb. 8 zeigt nun die gemessenen HGH-Konzentrationen im Serum derselben Blutprobe in Abhängigkeit von der Hämolyse. Es zeigt sich, daß schon eine mittelgradige Hämolyse die HGH-Bestimmung nach dieser Methode verfälscht.

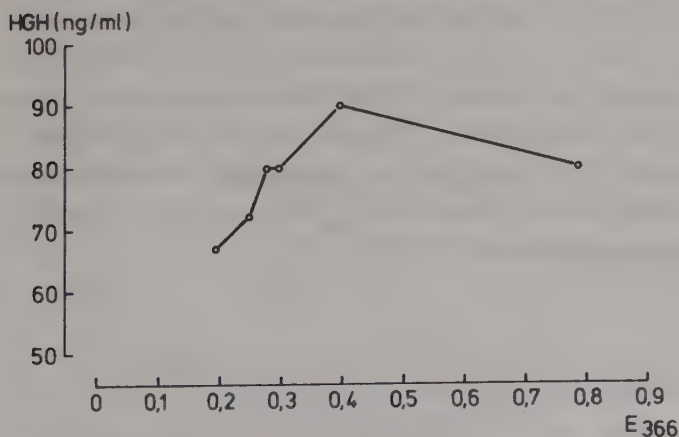


Abb. 8: Einfluß der Hämolyse auf die HGH-Bestimmung
mit der Doppelantikörpermethode

2.1.4.4.3 Einfluß von wiederholtem Auftauen des Serums auf die HGH-Bestimmung

Da immer wieder Seren bestimmt werden mußten, die 1 bis 2 Mal aus dem tiefgefrorenen Zustand auf Raumtemperatur aufgetaut worden waren, erschien es notwendig, den Einfluß des Auftauens auf die HGH-Bestimmung zu ermitteln. Verglichen wurde der HGH-Spiegel eines frischen Serums mit Fraktionen desselben Serums, die 1, 2, 3, 4, 5 und 10 Mal tiefgefroren und wieder aufgetaut wurden. Überraschenderweise zeigte sich, daß die HGH-Konzentrationen der verschiedenen Serumfraktionen nicht signifikant voneinander abwichen.

2.1.4.4.4 Verdünnungseffekt

Unspezifische Einflüsse von Serumproteinen im Radioimmunoassay sind beschrieben (17, 55a, 75, 106, 133). Deshalb ist es wichtig, den Proteingehalt der Standardproben und der Serumproben so anzugleichen, daß eine gewisse Variationsbreite des Serumprotein-gehalts, erzeugt z.B. durch Verdünnung, toleriert werden kann. Wir bestimmten eine konstante Menge HGH in unverdünntem Rinderserum sowie in bis maximal 1 : 50 ansteigenden Rinderserumverdünnungen. Es zeigte sich, daß eine Variation der Proteinkonzentration in diesem Bereich keinen wesentlichen Einfluß auf die HGH-Bestimmung hatte (Abb. 9).

2.1.4.4.5 Einfluß der hitzelabilen Komplementfraktion

Wir verwendeten frisches Serum, das zu einem Teil 30 Minuten lang auf 56 °C erwärmt wurde, wodurch die hitzelabile Komplementfraktion zerstört wurde. Von beiden Fraktionen wurden mehrere Verdünnungen hergestellt und die jeweilige HGH-Konzentration gemessen. Darauf wurde zu jeder Meßprobe eine konstante, in Borat-

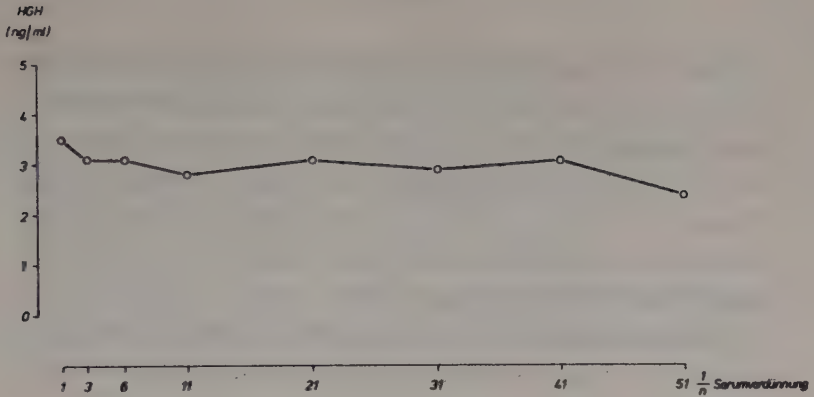


Abb. 9: Effekt der Verdünnung des Serums auf den gemessenen HGH-Spiegel (Doppelantikörpermethode)

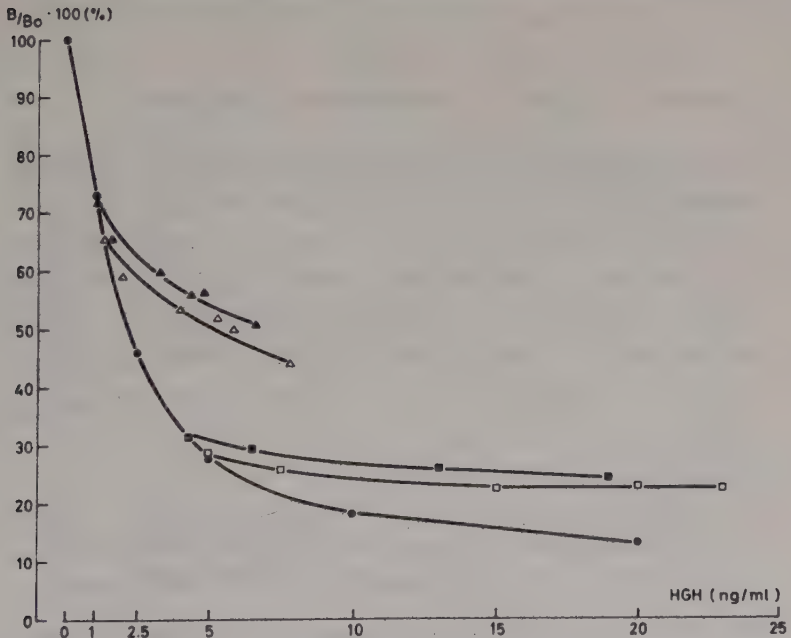


Abb. 10: Einfluß der hitzelabilen Komplementfraktion auf die HGH-Doppelantikörpermethode.

- — ● HGH-Standardkurve
- ▲ — ▲ Schwangerenserum
- △ — △ Komplementfreies Schwangerenserum
- — ■ Schwangerenserum mit Zusatz von exogenem HGH
- — □ Komplementfreies Schwangerenserum mit Zusatz von exogenem HGH

puffer gelöste Menge HGH zugegeben und wiederum die HGH-Konzentration bestimmt. Das Ergebnis zeigt Abb. 10. Da wir wegen der größeren Konzentration an Komplement Schwangerenserum verwendeten, mußten wir allerdings den Einfluß des HCS in Kauf nehmen. Es ist aber zu erkennen, daß in unserem System die hitzelablen Komplementfraktionen keinen Einfluß auf die Präzipitationsreaktion haben. Allerdings ist in unserem Lösungspuffer EDTA enthalten, das durch die Bindung der Ca-Ionen eine Aktivierung der Komplementfaktoren verhindert (17, 70, 106).

Als wichtiger Nebenfund ergab sich, daß HGH bei 56 °C seine Immunoreaktivität nicht einbüßt.

2.1.4.4.6 Präzipitation, Reaktionskinetik und Inkubation

In der Testvorschrift des HGH-SORIN-Kits sind für die Präzipitationsreaktion 4 °C und 24 Stunden angegeben. Wir haben die Inkubationszeit verkürzt und die bei 4, 22 und 37 °C präzipitierte Tracermenge untersucht, wenn kein unmarkiertes HGH in der Probe enthalten war (= Leerwert B_0) und wenn zusätzlich kein HGH-Antikörper enthalten war (= unspezifische Bindung). Die Reaktion wurde nach 4, 7, 22, 30, 46, 70, 78 und 144 Stunden durch Filtration unterbrochen.

Ergebnis:

- 1) Die Präzipitationsreaktion ist bei 4 °C und Raumtemperatur nach 7 Stunden, bei 37 °C wesentlich früher abgeschlossen.
- 2) Bei 37 °C erfolgt bei stark verlängerter Inkubationszeit eine meßbare Dissoziation des Präzipitats.
- 3) Die unspezifische Bindung war für alle gewählten Temperaturen gleich und erhöhte sich selbst nach 144 Stunden nicht, sondern blieb konstant bei 2 % der Gesamtaktivität.

Unsere nächste Untersuchung galt dem Zeitpunkt des Äquilibrium

der 1. Antigen-Antikörperreaktion bei 4° , 22° und 37°C . Dazu wurden Tracer und HGH-Antikörper 3, 5, 10, 15, 24, 31, 55 und 85 Stunden inkubiert und anschließend bei 37°C in 6 Stunden präzipitiert. In Abb. 11 ist das Ergebnis dargestellt.

- 1) Das Äquilibrium ist nach 31 Stunden erreicht.
- 2) Wenn das Äquilibrium erreicht ist, liegt allerdings der $(B/T)_0$ -Wert bei Raumtemperatur 37 % und bei 4°C sogar 51 % über dem Plateau, das bei 37°C erreicht wird.

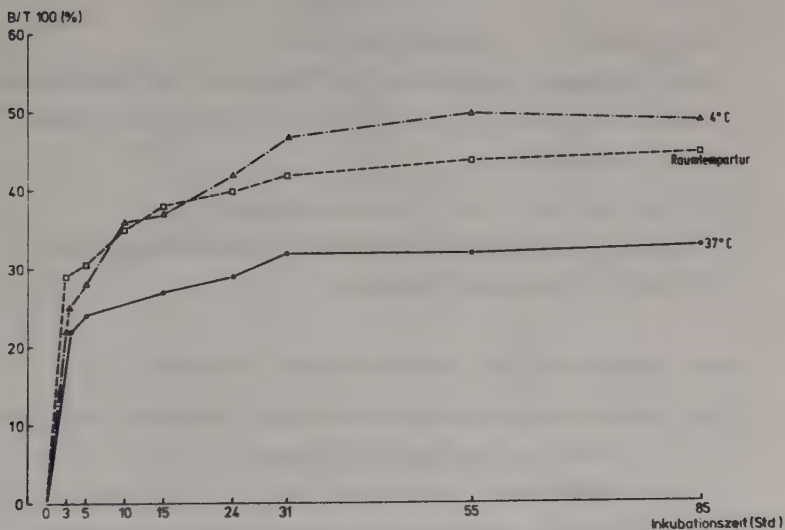


Abb. 11: Bindung von HGH-¹²⁵J an den HGH-Antikörper bei verschiedenen Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen

Um die Empfindlichkeit eines radioimmunologischen Systems zu verbessern, gibt es folgende Möglichkeiten:

- 1) Verlängerung der Vorinkubationszeit
- 2) Verringerung der Tracerkonzentration

Wir haben die Inkubationszeiten unseres früher beschriebenen

Systems in folgender Weise verändert:

1) Verlängerung der Vorinkubation:

12 Stunden bzw. 30 Stunden Vorinkubation bei 37°C , dann 18 Stunden Tracerinkubation bei 37°C und schließlich Präzipitation in 24 Stunden bei 4°C .

2) Verlängerung der Tracerinkubation:

6 Stunden Vorinkubation und 40 Stunden Tracerinkubation sowie 12 Stunden Vorinkubation und 40 Stunden Tracerinkubation. Präzipitation wie oben. Die Temperaturen analog.

3) Verlängerung der Präzipitationsreaktion:

Nach 6 Stunden Vorinkubation und 18 Stunden Tracerinkubation erfolgt die Präzipitation in 30 bzw. 46 Stunden. Die Temperaturen waren analog.

4) Verlängerung aller drei Inkubationsschritte:

24 Stunden Vorinkubation, 50 Stunden Tracerinkubation und 74 Stunden Präzipitationsreaktion.

Daraus folgerten wir das empfehlenswerte Vorgehen:

- Eine Verlängerung der Vorinkubation auf 30 Stunden verbessert den 50 %-Intercept gegenüber der Kontrollkurve um 50 % auf 1,1 ng/ml HGH (Abb. 12). Während sich der 50 %-Intercept wesentlich änderte, blieb der $(B/T)_0$ -Wert annähernd konstant.
- Eine Verlängerung der Inkubationszeit mit dem Tracer verschlechtert die Sensitivität, wohingegen die Verlängerung der Inkubationszeit mit dem 2. Antikörper keine Veränderung bringt.
- Eine Verlängerung aller Inkubationszeiten bringt ebenfalls keine Vorteile.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, war es dringend notwendig, die Sensitivität der Methode zu erhöhen und dabei allerdings einen eingeschränkten Meßbereich in Kauf zu nehmen.

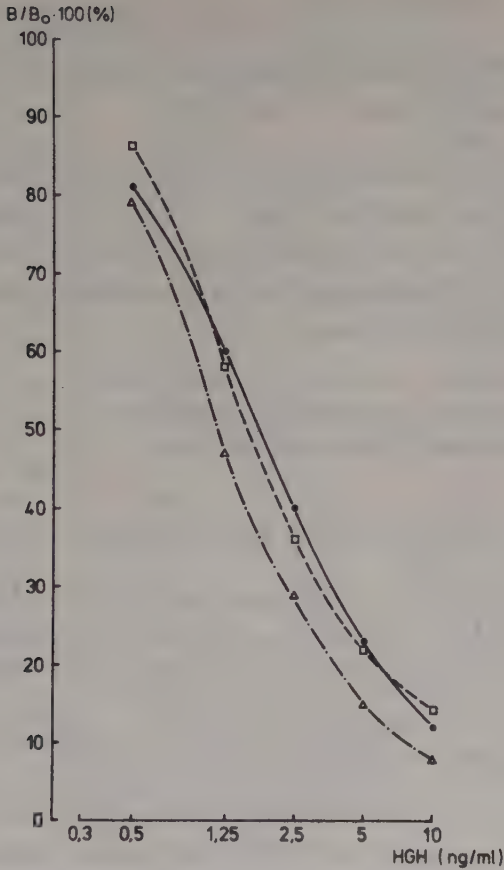


Abb. 12: Erhöhung der Sensitivität der Doppelantikörper-
methode durch Vorinkubation.
● — ● Eichkurve mit 6 Stunden Vorinkubation
(Kontrollkurve)
□ --- □ 12 Stunden Vorinkubation
△ -.- △ 30 Stunden Vorinkubation

2.1.4.4.7 Qualitätskontrolle

2.1.4.4.7.1 "Within assay"-Variationskoeffizient
(siehe Kapitel 2.1.4.1.4)

Vier Seren wurden so ausgewählt, daß an vier verschiedenen Stellen der Eichkurve abgelesen wurde. Wegen der Nichtlinearität der Eichkurve läßt sich aus dem Variationskoeffizienten der Zählrate/Zeit nicht unbedingt auf den Variationskoeffizient der Serumkonzentrationen schließen.

Tab. 3: Präzision der Doppelantikörpermethode:
"Within assay"-Variationskoeffizient

I	II	III	IV	V
N = 28	57,1 $\pm$ 2,3	4 %	1,4 $\pm$ 0,2	11 %
N = 30	29,6 $\pm$ 1,1	3,6 %	4,5 $\pm$ 0,2	4 %
N = 29	18,4 $\pm$ 1,3	6,8 %	10,6 $\pm$ 1,6	15 %
N = 29	15,3 $\pm$ 0,8	5,5 %	15,8 $\pm$ 1,5	10 %

Erklärung: I = Anzahl der Stichproben eines Serums
 II = $B/B_0 \pm s$ in %
 III = Variationskoeffizient der B/B_0 -Werte
 IV = Serum-HGH-Konzentrationen (ng/ml)
 V = Variationskoeffizient der Serumkonzentrationen

2.1.4.4.7.2 "Between assay"-Variationskoeffizient
(siehe Kapitel 2.1.4.1.4)

In vier verschiedenen Seren wurde der HGH-Spiegel an verschiedenen Tagen bestimmt und der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert gebildet.

Tab. 4: Präzision der Doppelantikörpermethode:

"Between assay"-Variationskoeffizient

Anzahl der gemessenen Serumproben	Serum-HGH-Konzentration (ng/ml)	Variationskoeffizient der Konzentration
N = 18	1,0 $\pm$ 0,8	57,5 %
N = 14	2,9 $\pm$ 1,7	83,9 %
N = 18	48,5 $\pm$ 4,9	10,1 %
N = 18	75,1 $\pm$ 12,8	17 %

Wegen der großen Schwankungen im Bereich niedrigste HGH-Konzentrationen verbesserten wir die Methode (siehe 2.1.4.4.6).

2.1.4.4.7.3 Präzisionsserum und Wiederfinderate

Zum Serum eines "hypophysektomierten" Patienten mit einer HGH-Konzentration von 0,6 ng/ml wurde HGH bis zu einer Endkonzentration von 20,6 ng/ml zugesetzt. Gemessen wurde die HGH-Konzentration des 1 : 10 verdünnten Serums. Dabei ergab sich eine Abweichung von weniger als ± 5 % von dem zu erwartenden Wert, entsprechend einer Wiederfinderate von 95 %.

2.1.4.4.7.4 Sensitivität

Unter der Sensitivität einer Methode verstehen wir die untere Nachweisgrenze (38). In Ermangelung eines absolut HGH-freien Humanserums verwendeten wir Rinderserum.

Wir berechneten folgenden Quotienten:
$$S = \frac{B_o - N - 3s}{B_o - N} \times 100 (\%)$$

Der an der Standardkurve zu S gehörige Abszissenwert gibt die untere Nachweisgrenze in ng/ml an. Sie betrug für die nicht verbesserte Methode (siehe 2.1.4.4.1) 0,3 ng/ml.

2.1.4.4.7.5 Spezifität, siehe Kapitel 3.1.2.0.0

2.1.4.5.0 Methodenvergleich

Es wurden die HGH-Konzentrationen eines Serums mit verschiedenen Methoden bestimmt und verglichen. Wir verglichen die Solid Phase-Methode mit der Doppelantikörper-Methode sowie die Charcoal-Methode mit der Doppelantikörper-Methode. Die Salzpräzipitationsmethode konnte nicht korreliert werden, da eine zu geringe Anzahl von Stichproben gemessen wurde.

2.1.4.5.1 Solid Phase (Ordinate y) - Doppelantikörper
(Abszisse x)

Anzahl der verglichenen Proben: $N = 32$

Korrelationskoeffizient: $r = 0,9807$

Die Korrelation war signifikant auf dem 0,1 %-Niveau

Regressionsgerade: $\text{logit } y = 1,008 \log x + 2,12$

2.1.4.5.2 Charcoal (Ordinate y) - Doppelantikörper
(Abszisse x)

Anzahl der Stichproben: $N = 70$

Korrelationskoeffizient: $r = 0,7616$

Die Korrelation war signifikant auf dem 0,1 %-Niveau

Regressionsgerade: $\text{logit } y = 0,5759 \log x + 6,0244$

In Abb. 13 werden die Standardkurven aller vier beschriebenen Methoden verglichen (siehe Diskussion).

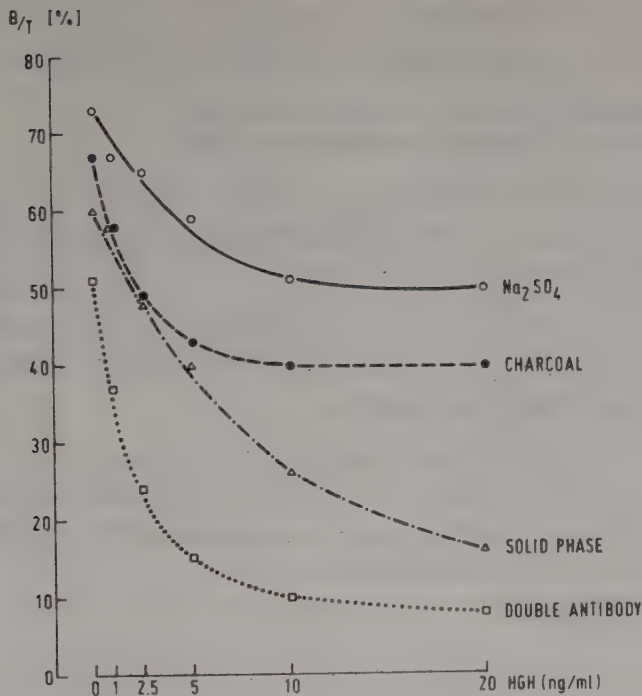


Abb. 13: Vergleich der Standardkurven von vier Methoden der radioimmunologischen HGH-Bestimmung

2.2.0.0.0 HCS-Bestimmung

Für die Bestimmung des HCS verwendeten wir Testkits der Firma S. O. R. I. N. Im folgenden sind die Reagenzien beschrieben:

1) Phosphatpuffer 0,04 M, pH 7,4

Zum Lösen der Antisera, des jodierten und des Standard-HCS und zur Serum-Verdünnung.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,52 g

Thiomersal, MG 404,84 (Schuchard, München,

Nr. 67517) 0,25 g

Serumalbumin vom Rind (Behringwerke AG)	5,00 g
Triplex III (Reagenzien Merck, Nr. 8418)	7,46 g

Mit 2 N Natronlauge (Reagenzien Merck, Nr. 9136) um pH 7,4 einzustellen.

Auffüllen mit deionisiertem Wasser auf 1 Liter.

- 2) HCS-Antikörper vom Kaninchen, lyophilisiert. Der Inhalt eines Gläschens wurde mit 10 ml Phosphatpuffer gelöst, so daß 40 - 60 % des HCS-¹²⁵J gebunden werden.
- 3) Präzipitierender Antikörper (= 2. Antikörper) (Anti-Kaninchen-Gammaglobulin von der Ziege). Auch hier wurde der Glasinhalt mit 10 ml Phosphatpuffer gelöst.
- 4) Lyophilisiertes Jod-markiertes HCS (Jod-125-Isotop, elektrolytische Markierung nach U. ROSA (124b); spezifische Aktivität 60 mCi/mg, 50 ng/Glas) wurde mit Phosphatpuffer bis zu einer Konzentration von 2 ng HCS/ml verdünnt.
- 5) Standard-HCS:
10 g gefriergetrocknetes HCS wurden in 10 ml Phosphatpuffer gelöst. Diese Lösung wurde weiter verdünnt bis zur HCS-Konzentration von 200 ng/ml. Aus dieser Stammlösung werden die Punkte der Standardkurve erstellt. Durch Verdünnen mit Phosphatpuffer ergeben sich folgende Konzentrationen: 200, 100, 50, 25 und 10 ng HCS/ml.
- 6) Serumverdünnung:
Die HCS-Konzentrationen während der Schwangerschaft liegen im µg/ml-Bereich und steigen bis zum Ende des 3. Trimesters an, so daß je nach Dauer der Schwangerschaft verschieden verdünnt werden muß. Wir hielten uns an folgendes Schema:

Bis zur 15. Woche der Schwangerschaft:	1: 25 - 1: 50
15. bis 25. Woche der Schwangerschaft:	1: 50 - 1:100
25. bis 35. Woche der Schwangerschaft:	1:200 - 1:400

Bestimmungsschema:

I. Inkubation für 6 Stunden bei 4 °C

	Standard- kurve	Serum- proben	unspezif. Bindung N	Leerwert B ₀
Standard-HCS	0,1 ml			
Serum		0,1 ml		
HCS-Antikörper	0,1 ml	0,1 ml		0,1 ml
Phosphatpuffer			0,2 ml	0,1 ml

II. Inkubation für 18 Stunden bei 4 °C

HCS- ¹²⁵ J	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
-----------------------	--------	--------	--------	--------

III. Inkubation für 18 Stunden bei 4 °C

Präzipitierender Antikörper	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
--------------------------------	--------	--------	--------	--------

IV. Filtration über Celluloseazetatfilter nach BOTTERMANN et al. (34)

V. Messen der Filteraktivität im Gammazähler

VI. Aufstellen der Eichkurve und Berechnung der Serumkonzentration.

2.2.1.0.0 Präzisionsserum

Die HCS-Bestimmung wurde mit einem Präzisionsserum kontrolliert. 1 ml eines gefriergetrockneten Schwangerenserums, das mit Phosphatpuffer 1 : 100 verdünnt war, wurde in 2 ml Phosphatpuffer wieder aufgelöst, so daß eine Verdünnung von 1 : 200 resultierte. Dies wurde mit Phosphatpuffer auf 1 : 400 weiter verdünnt. Die Abweichung vom berechneten Serumspiegel betrug maximal 2 %.

2.2.2.0.0 Komplement

Bekanntlich sind in der Schwangerschaft die Komplementfaktoren im

Serum vermehrt (70). Es war daher besonders interessant, den Einfluß der hitzelabilen Komplementfraktion auf unseren HCS-Radioimmunoassay zu untersuchen, da der Einfluß des Komplements auf die Präzipitationsreaktion der Doppelantikörper-Methode beschrieben wurde (17, 106). Das Serum einer Patientin, die kurz vor dem Geburtstermin stand, wurde in zwei Fraktionen geteilt und eine Fraktion 30 Minuten lang bei 56 °C inkubiert. Darauf wurden beide Fraktionen parallel in jeweils fünf verschiedenen Verdünnungen (1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400) auf die HCS-Konzentration hin untersucht. Die Serum-HCS-Spiegel beider Gruppen waren gleich. Daraus ergibt sich

- a) daß die hitzelabile Komplementfraktion keinen Einfluß hat, was durch die hohe Serumverdünnung und den EDTA-Zusatz des Puffers verständlich erscheint,
- b) daß die immunologische HCS-Aktivität bei 56 °C nicht verändert wird.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 5.

Tab. 5: Einfluß der hitzelabilen Komplementfraktion auf das HCS-Doppelantikörper-System

Serumverdünnungen:	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 300
Serum mit Komplement (ng/ml):	1110	1120	1120	1105
Serum, Komplement hitze- inaktiviert (ng/ml):	1140	1160	1160	1150

2.2.3.0.0 Spezifität siehe 3.1.4.2.0

2.3.0.0.0 Glukosebestimmung im Serum und im Blut

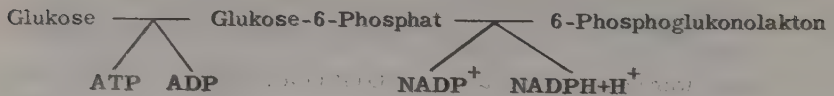
Wird die Glukosebestimmung im Blut durchgeführt, so versetzt man 0,05 ml Blut sofort nach der Abnahme aus der Fingerbeere bzw. in unseren Versuchen aus einer Kubitalvene mit 0,5 ml einer 0,33 N Perchlorsäure (Biochemica, Boehringer GmbH, Mannheim, Best.-Nr. 15 900) zur Enteiweißung; anschließend kräftiges Schütteln oder Mischen auf dem Vortex-Mixer sind unbedingt notwendig. Die Enteiweißung findet in Eppendorf-Kunststoff-Gefäßen, die anschließend 1 Minute lang in einer Spezialzentrifuge zentrifugiert werden, statt. Der Überstand wird weiterverarbeitet.

Wird Glukose im Serum bestimmt, so wird das Blut in eisgekühlten Kunststoffröhrchen aufgefangen. Zur besseren Sedimentation werden Asal Z-Kunststoffperlen zugegeben. Zentrifugiert wird 15 Minuten mit 1500 g bei Zimmertemperatur. Zur Enteiweißung werden 0,100 ml Serum mit 1 ml einer 0,33 N Perchlorsäure versetzt. Die Zentrifugation des gut geschüttelten Reaktionsgemisches erfolgt in gläsernen Spitzgläsern bei 1500 g für 15 Minuten in Raumtemperatur.

Vom Überstand des enteiweißten Blutes bzw. Serums werden jeweils 0,05 ml zu 0,5 ml des Reaktionsgemisches in ein Eppendorfgefäß gegeben. Von jeder Probe werden Doppelbestimmungen ausgeführt. Der "Leerwert" enthält 0,05 ml der 0,33 N Perchlorsäure und 0,5 ml Reaktionsgemisch. Die Bestimmung der Glukose erfolgt mit der Hexokinasmethode (Biochemica-Test-Kombination der Fa. Boehringer Mannheim GmbH). Das Reaktionsgemisch besteht aus:

- 26 Volumina 0,3 M Triäthanolaminpuffer pH 7,5 mit 4 mM Mg-Sulfat
- 1 Volumen 12 mM NADP
- 1 Volumen 16 mM ATP
- 0,2 Volumina 1 mg Hexokinase/ml und
1 mg Glukose-6-Phosphat dehydrogenase/ml

Prinzip der Glukosebestimmung mit der Hexokinasereaktion:



Nach 15 Minuten ist die Reaktion vollständig abgelaufen. Das entstandene NADPH wird durch Extinktionsmessung bei 366 nm nachgewiesen (Eppendorffphotometer, Mikroküvette, 1x4-Spalt). Die Eichung des Eppendorffphotometers erfolgt gegen aqua dest. Die Extinktion des "Leerwertes" muß von der Extinktion der Proben subtrahiert werden. Die Differenz ergibt mit 651 multipliziert den Glukosespiegel in mg/100 ml Blut bzw. Serum.

Der Variationskoeffizient von Tag zu Tag eines Kontrollserums, das bei jedem Test mitbestimmt wird, beträgt 1,95 %.

2.4.0.0.0 Bestimmung der freien Fettsäuren (FFA) im Serum

Das Prinzip der Messung der nicht veresterten Fettsäuren nach DUNCOMBE: Die freien Fettsäuren werden als Kupfersalze mit Chloroform extrahiert. Die Kupferseifen werden mit Diäthylthiocarbaminat in einen gelben Kupferkomplex überführt und kolorimetrisch bestimmt.

Reagenzien:

- 1) Chloroform (Reagenzien Merck, Nr. 2445)
- 2) Kupfer-(II)-nitrat (Reagenzien Merck, Nr. 2753)
- 3) Triäthanolamin-Hydrochlorid, kristallisiert (Boehringer Mannheim GmbH, Best. Nr. 15325 HTAA)
- 4) Natriumdiäthylthiocarbaminat (Reagenzien Merck, Nr. 6689)
- 5) Butanol-2 (Reagenzien Merck, Nr. 9630)
- 6) Palmitinsäure (Serva, Heidelberg)
- 7) 1 N Essigsäure

Herstellung der Lösungen:

- 1a) Kupferreagenz: 6,45 g Kupfer-II-nitrat in einen 100 ml-Meßkolben, der bis zur Eichmarke mit aqua bidest. aufgefüllt wird.
- 1b) 18,57 g Triäthanolamin-Hydrochlorid werden in einen 100 ml-Meßkolben gegeben und mit aqua bidest. bis zur Eichmarke aufgefüllt.
- 1c) 9 Teile der Lösung Nr. 1b werden gemischt mit 1 Teil der 1 N Essigsäure. Lösung 1a gemischt im Verhältnis 1 : 1 mit Lösung 1c ergibt das Kupferreagenz.
- 2) 100 mg Natriumdiäthylthiocarbaminat gelöst in 100 ml Butanol-2.
- 3) Palmitinstandard: 400 µval
Stammlösung: 1 mM; 25,64 mg auf 100 ml Chloroform
Standardlösung: 4 ml der Stammlösung auf 100 ml Chloroform ergeben 40 µval/l Palmitinsäure. Da in die Reaktion die 10-fache Standardmenge bezogen auf die Serummenge eingesetzt wird, wird in der Rechnung 400 µval/l eingesetzt.

Durchführung der Bestimmung:

- 1) 5 ml Chloroform werden in jedes Reagenzschliffglas einpipetiert. In das "Standard"-Reagenzglas werden 5 ml Palmitinstandard gegeben.
- 2) 2,5 ml Kupferreagenzlösung werden in jedes Reagenzglas gegeben.
- 3) 0,5 ml Serum werden in jedes Reagenzglas einpipettiert, außer in "Leerwert" und "Standard". Die Schliffgläser werden mit lipoidunlöslichen Kunststoffstöpseln verschlossen.
- 4) 30 Minuten lang werden alle Proben in einer Schüttelmaschine gleichmäßig gemischt.

- 5) Danach werden alle Proben in spitze Zentrifugengläser umgeschüttet und 15 Minuten bei 5700 g zentrifugiert.
- 6) Mit einer Kunststoffkapillare, die an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist, werden die wäßrige Phase, die darunter liegende Eiweißschicht und die an der Wand haftenden Tropfen sorgfältig abgesaugt.
- 7) 3 ml des Chloroformrückstandes werden mit einer 3 ml-Auslaufpipette in ein Schliffglas überführt. Es ist sorgfältig darauf zu achten, daß die Pipette nicht mit Kupferrückständen in Berührung kommt!
- 8) 0,5 ml Natriumdiäthylthiocarbaminatlösung werden in jedes Schliffglas einpipettiert und dieses sofort mit Glasstöpsel verschlossen. Kurz vor der Messung werden die Gläser geschüttelt.
- 9) Messung der Extinktionen bei 436 nm im Eppendorffphotometer: Nullpunkteinstellung des Photometers auf den Leerwert; 2,5x12-Spalt; Durchlaufmikroküvette.

10) Berechnung:

$$\text{FFA } \left(\frac{\text{mval}}{\text{l}} \right) = \text{Extinktion}_{(\text{Probe})} \cdot \frac{4}{\text{Extinktion}_{(\text{Standard})}}$$

Qualitätskontrolle: Der Variationskoeffizient bei 12 Bestimmungen eines Mischserums betrug 1,7 %.

Hämolytische Seren werden falsch bestimmt.

Es ist unbedingt darauf zu achten, daß die Blutproben gekühlt und schnell verarbeitet werden.

2.5.0.0.0 Insulinhypoglykämie Test (IHT)

Der durch Insulin induzierte rasche Blutzuckerabfall ist ein wichtiger Stimulationstest für die HGH-Sekretion (125, 126). Eingeführt wurde dieser Test durch ROTH et al. 1963. Wir führten den IHT in folgender Weise durch: Der Test wurde am nüchternen Patienten unter Grundumsatzbedingungen durchgeführt. Zunächst wurden etwa 20 ml Blut aus einer Kubitalvene mit einer Kunststoffeinmalspritze abgezogen oder besser unter Stauung in einem Kunststoffröhrchen aufgefangen (Hämolyse unbedingt vermeiden!). Physiologische Kochsalzlösung diente anschließend zum Offenhalten der Kanüle. (= 1. Nüchternwert, - 15 min).

Nach 15 Minuten wurde der zweite Nüchternwert (0 min) abgenommen und sofort 0,15 E Alt-Insulin/kg Körpergewicht intravenös injiziert. 30, 45, 60 und 90 Minuten nach der Insulingabe wurde jeweils 20 ml Blut abgenommen. Das Blut stand bis zur Zentrifugation in Eiswasser, und die Portion zur Blutglukosebestimmung wurde sofort mit Perchlorsäure enteiweißt (siehe 2.1.). Nach Zugabe von Kunststoffkörner zur schärferen Abtrennung von Blutkuchen und Serum wurden die Blutproben bei 1500 g 15 Minuten zentrifugiert. Die Seren wurden bis zur Bestimmung tiefgefroren. Aus jeder Probe wurden Blutglukose, HGH und Cortisol bestimmt.

2.6.0.0.0 Jugulariskatheter

Zur Gewinnung von Blut aus dem Bulbus cranialis venae jugularis katheterisierten wir die rechte Vena jugularis interna. Die Lage des von dort vorgeschobenen Katheters im Bulbus wurde am Bildwandler kontrolliert. Für das Legen des Jugulariskatheters danken wir Herrn Dr. Klemm (Röntgenabteilung der II. Medizinischen Klinik). Gleichzeitig wurde eine Kubitalvene punktiert und der oben beschriebene Insulinhypoglykämietest durchgeführt. Zu den angege-

benen Zeiten wurden gleichzeitig aus dem Bulbus cranialis venae jugularis und aus der Kubitalvene Blutproben entnommen. In den Blutproben wurden bestimmt: Blutglukose, freie Fettsäuren, Cortisol, HGH, LH und TSH.

2.7.0.0.0 Argininbelastungstest

1965 beschrieben MERIMEE et al. (103) einen Anstieg des HGH-Spiegels im Blut nach Infusion der Aminosäure Arginin.

Die intravenöse Argininbelastung hat sich seither als Routine-Test für die Provokation der HGH-Sekretion bewährt. Die Belastung wurde morgens am nüchternen Patienten unter Grundumsatzbedingungen durchgeführt. Zunächst wurden je 10 ml Blut aus einer Kubitalvene im Abstand von 15 Minuten (N_1 , -15 min) entnommen und eine Kochsalzinfusion zum Offenhalten der Kanüle angelegt. Nach der zweiten Blutabnahme (N_2 , 0 min) wurden innerhalb von 30 Minuten 500 ml einer 6 %-Argininlösung (pyrogenfrei) infundiert. Weitere Blutproben wurden 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Beginn der Infusion abgenommen. Bestimmt wurde die Blutglukose, der Serum-HGH-Spiegel, sowie bei einer Patientin der Serum-Insulin-Spiegel.

2.8.0.0.0 Cortisolbestimmung

Die fluorimetrische Messung der 11-Hydroxy-Corticosteroide erfolgte mit einer modifizierten Methode nach MATTINGLY et al. (182). Unser Dank gilt Herrn Dr. O. A. Müller (77).

2.9.0.0.0 Oraler Glukosetoleranztest (OGTT)

Erhöhte GH-Nüchternspiegel werden bei Gesunden eine Stunde nach

Gabe von Glukose unterdrückt (32, 149, 149b).

Der Belastungstest wird morgens am nüchternen Patienten durchgeführt. Zunächst werden zweimal im Abstand von 15 Minuten ($N_1 = -15$ min; $N_2 = 0$ min) 5 ml Blut aus einer Kubitalvene entnommen und die liegende Kanüle mit einer Kochsalzinfusion durchgängig erhalten. Anschließend trinkt der Patient 100 g Glukose, in Wasser gelöst. Die weiteren Blutabnahmen erfolgen nach 60, 120 und 180 Minuten nach Glukosegabe. Bestimmt wurden jeweils die Blutglukose und der Serum-HGH-Spiegel.

3.0.0.0.0 ERGEBNISSE

3.1.0.0.0 Untersuchungen zur Immunoreaktivität von HGH und HCS

3.1.1.0.0 Standardpräparationen

Ein wesentliches Kriterium für die Funktionsfähigkeit eines radioimmunologischen Testes muß die Unabhängigkeit von der jeweiligen Verdünnung des Serums sein, das auf seine Hormonkonzentration hin untersucht werden soll, d.h. verschiedene Verdünnungen müssen nach der Multiplikation mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor dieselbe Endkonzentration ergeben. Diese Voraussetzung wird durch die Korrektur der Proteinverhältnisse in der Eichkurve in Bezug auf die durchzuführenden Serumverdünnungen erreicht. Auch in hohen Serumverdünnungen war unser Doppelantikörper-System stabil (siehe 2.1.4.4.4).

Da die oben genannte Bedingung erfüllt war, mußten verschiedene HGH-Präparationen bei ihrer Verdünnung einen mit der Teststandardkurve identischen Kurvenzug ergeben.

Untersucht wurden:

- 1) HGH der NIH, Bethesda, Maryland (USA), HS 1394 (GH-Aktivität 2 I.E. /mg, Prolaktin-Aktivität 6 I.E. /mg; von Dr. Wilhelmi zur Verfügung gestellt)
- 2) HGH - Abbott, Abbott Laboratories, Chicago/Ill. (USA)
(2 I.E. /mg)
- 3) HGH - "Kabi" der Deutschen Kabi GmbH, München (BRD)
(Präparation nach ROOS, 2 I.E. /mg)
- 4) HGH - S.O.R.I.N. (2 I.E. /mg), Società Ricerche Impianti Nucleari, Saluggia (Italien) (Präparation nach WILHELMI)

3.1.1.1.0 NIH-Wachstumshormon

Gibt man für jede gemessene Verdünnung das Produkt aus Verdünnungsfaktor und Serumkonzentration an, so zeigt es sich, wie aus Tab. 6 zu entnehmen ist, daß der relative Fehler bezogen auf den Mittelwert, der Extrema kleiner als 10 % war und somit in der Fehlerbreite der Methode lag.

Tab. 6: Immunoreaktivität des NIH-Wachstumshormons

Verdünnungen des NIH-Wachs- tumshormons	1:5	1:6	1:11	1:16	1:26	1:31	1:36	1:51	1:61
HGH (ng/ml) abgelesen an der Standardkurve (S. O. R. I. N.)	73	78	80	77	78	72	72	82	73

Als weiteres Indiz für die gleiche Immunoreaktivität benutzten wir die graphische Darstellung der Standardkurve und der Verdünnung in folgender Weise:

Als Bezugspunkt aller Verdünnungen wurde diejenige Verdünnung ausgewählt, deren B/B_0 -Wert in etwa einer HGH-Konzentration von 1 ng/ml entsprach. Für diesen Wert wurde nun die Endkonzentration abgelesen. Daraus wurde nun die zu erwartende HGH-Konzentration für jede einzelne Verdünnung berechnet. Diese HGH-Konzentration wurde nun als Abszissenwert für den zugehörigen B/B_0 -Wert eingetragen und der sich aus der Verbindung dieser Punkte ergebende Kurvenzug mit der Standardkurve verglichen. Vereinbarungsgemäß liegt der Bezugspunkt immer auf der Standardkurve, die übrigen Verdünnungspunkte nur dann, wenn eine gleiche Immunoreaktivität vorliegt. In Abb. 14 sind die vier untersuchten Standardpräparationen in den unter 2.1.1. beschriebenen graphischen Darstellungsmöglichkeiten aufgeführt. Weiter verwendet wurde die Logit-Transformation, da sie über einen weiten Bereich linear war und somit für

die Parallelitätsbetrachtung und die statistische Erfassung am geeignetsten war.

3.1.1.2.0 "Abbott"-HGH

Als nächstes untersuchten wir die Standardlösung aus dem HGH-¹²⁵J Imusay Kit No. 7764 der Abbott Laboratories, die 8 ng/ml HGH-NPA HS 1216-C enthalten sollte. Wir bestimmten die HGH-Konzentration mit 7,4 ng/ml, was einer Abweichung von 7 % entspricht. Die Verdünnungskurve verlief somit nicht völlig identisch, war aber parallel zur Referenzstandardkurve. Durch Parallelverschiebung zur Ordinate legten wir die Punkte der Verdünnungskurve auf die Standardkurve. Als Bezugspunkt benutzten wir wiederum den Punkt, für den wir etwa die Konzentration 1 ng/ml bestimmt hatten. Die graphische Darstellung erfolgt wiederum in Abb. 14. In Tab. 7 sind die relativen HGH-Serumendkonzentrationen für die entsprechenden Verdünnungen eingetragen:

Tab. 7: Immunoreaktivität des "Abbott"-HGH

Verdünnungen des Abbott-HGH	Unver- dünnt	3:4	1:2	1:4	1:8
HGH (ng/ml) abgelesen an der Standardkurve (S. O. R. I. N.)	7,4	7,4	7,3	6,8	7,2

3.1.1.3.0 "Kabi"-HGH

Auch hier wurden die Verdünnungen unter Beachtung der Proteinverhältnisse durchgeführt. Die identische Immunoreaktivität ergab sich aus Darstellung in Abb. 14 und aus folgender Tab. 8.

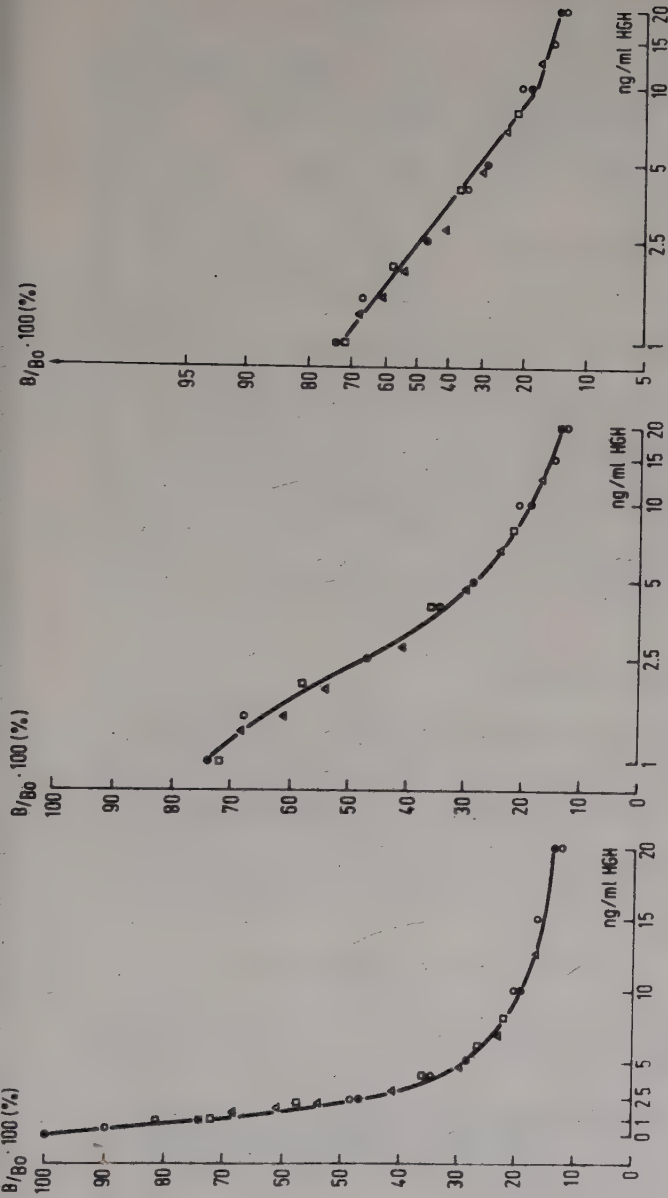


Abb. 14:

HGH-Standardkurven.

Mitte: B/B_0 linear, HGH-Konzentration logarithmisch aufgetragen.

transformiert, HGH-Konzentration logarithmisch aufgetragen.

HGH-NIH, Bethesda, Md. (HS 1394, 2 I.E./mg) (o — o);

HGH-Abbott (2 I.E./mg), Abbott Laboratories, Chicago/III. (□ — □);

HGH-"Kabi", Deutsche Kabi GmbH, München (Präparation nach Roos, 2 I.E./mg) (Δ — Δ);

HGH-S.O.R.I.N. (2 I.E./mg), Società Ricerche Impianti Nucleari, Saluggia, Italien

("Wilhelmi") (● — ●)

Tab. 8: Immunoreaktivität des "Kabi"-HGH

Verdünnungen des "Kabi"- HGH	1:5	1:10	1:20	1:40	1:100	1:200
HGH (ng/ml) abgelesen an der Standardkurve (S. O. R. I. N.)	100	115	92	96	100	100

3. 1. 2. 0. 0 Kreuzreaktionen mit dem HGH-Antikörper

Unter Kreuzreaktion verstehen wir nach F. A. KABAT (70) die serologische Verwandtschaft verschiedener Einzelantigene, die gleiche oder ähnliche Strukturen im Molekül aufweisen und deshalb mit den Antikörpern gegen jedes andere dieser Antigene reagieren.

3. 1. 2. 1. 0 Kreuzreaktion mit HCS

Die Abb. 15 zeigt die Kreuzreaktion mit unserem HGH-Antikörper (Meerschweinchen). Es lassen sich zwei Bereiche unterschiedlicher Kreuzreaktivität abgrenzen: Bis 100 ng/ml HCS verhalten sich HGH : HCS wie 1:200, d.h. 200 ng HCS verdrängen 1 ng HGH vom Antikörper. Im Bereich über 10 000 ng/ml HCS ist das Verhältnis HGH : HCS = 1:10 000.

3. 1. 2. 2. 0 Kreuzreaktion mit TSH

Das von uns untersuchte TSH (NIH, Bethesda, Md., biologische Aktivität 3,5 I.E. /mg) verdrängt HGH im Verhältnis 100:1. Graphische Darstellung siehe Abb. 15.

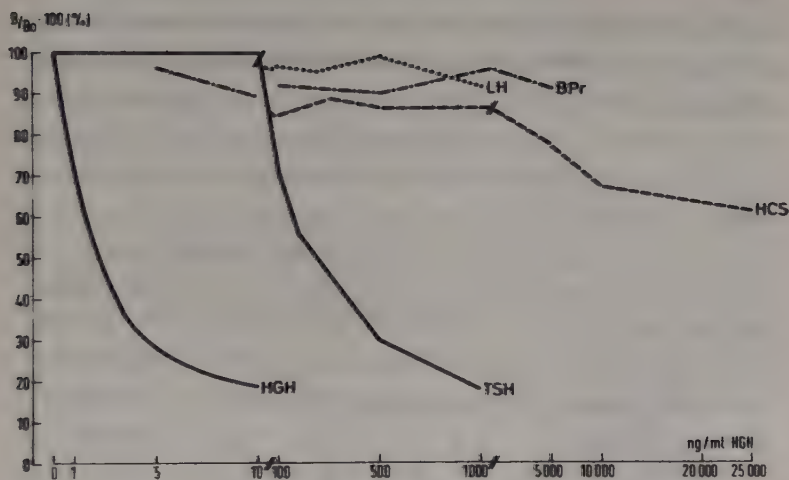


Abb. 15: Kreuzreaktion von TSH, HCS, LH und BPr mit dem HGH-Antikörper (Meerschweinchen)

3. 1. 2. 3. 0 Kreuzreaktion mit LH

Das luteinisierende Hormon (LH) zeigte mit unserem Antikörper keine Kreuzreaktion (Abb. 15). (Aus Humanhypophysen extrahiertes LH der biologischen Aktivität 3,7 NIH-S₁)

3. 1. 2. 4. 0 Kreuzreaktion mit Rinderprolaktin

Rinderprolaktin (BPr) wurde uns freundlicherweise von Dr. Schams, Weihenstephan, zur Verfügung gestellt. In unserem Doppelantikörper-System zeigte Rinderprolaktin mit dem HGH-Antikörper keine nennenswerte Kreuzreaktion (Abb. 15).

3.1.3.0.0 HGH-Bestimmung bei Galaktorrhoe

Da uns menschliches Prolaktin nicht zur Verfügung stand, benützten wir ein Verfahren, das GREENWOOD et al. (54) bereits erfolgreich für das HCS angewandt hatten, um die Kreuzreaktivität zu prüfen. Durch Verdünnungsanalyse ermittelten wir die Immunoreaktivität des Serums einer Patientin mit hohem endogenen Prolaktinspiegel (Forbes-Albright-Syndrom) (genauerer siehe 3.3.) bezüglich unseres HGH-Systems und stellten das Ergebnis in Abb. 16 graphisch nach dem unter 3.1.1.1. beschriebenen Verfahren dar.

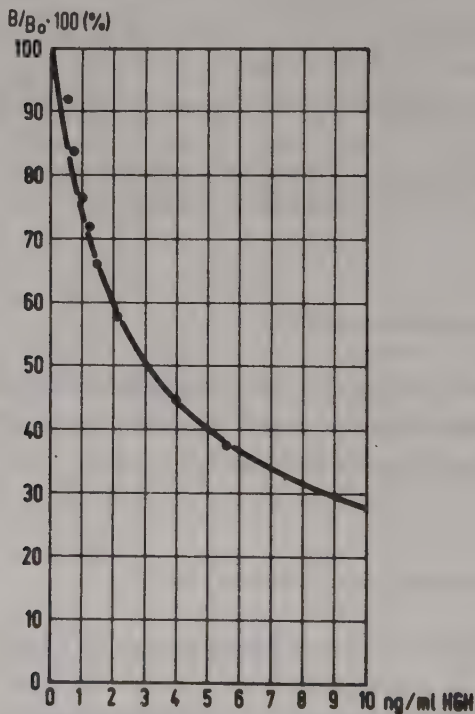


Abb. 16: Verdünnungskurve eines Serums von einer Patientin mit Forbes-Albright-Syndrom. Prolaktinspiegel 3200 ng/ml, GH-Konzentration 5,6 ng/ml. Die Punkte der Serumverdünnung liegen auf der HGH-Standardkurve.

Aus der Verdünnungskurve kann man entnehmen, daß das Prolaktin nicht mit unserem HGH-Antikörper reagiert. Die radioimmunologische Prolaktinbestimmung (homologes Humansystem) wurde dankenswerterweise von Dr. FRIESEN, McGill-Universität, Montreal, durchgeführt. Der Prolaktinspiegel im untersuchten Serum betrug 3200 ng/ml (normal: 25 ng/ml).

3.1.4.0.0 HGH-Bestimmung in der Schwangerschaft

Bereits 1964 wurde von GREENWOOD et al. (54) auf die Beeinflussung der HGH-Bestimmung in der Schwangerschaft durch das HCS hingewiesen. Auch in unserem Doppelantikörper-System war dies zu erwarten, bedenkt man die unter 3.1.2.1. beschriebene Kreuzreaktion mit dem HGH-Antikörper.

3.1.4.1.0 HGH- und HCS-Bestimmung

Tabelle 8 zeigt die HGH- und HCS-Serumspiegel von schwangeren Patientinnen im letzten Schwangerschaftstrimenon. Die HGH-Werte wurden bei einer Verdünnung von 1 : 6 gemessen (siehe Diskussion).

Tab. 8: HGH- und HCS-Serumspiegel in der Schwangerschaft

Patientin	Schwanger- schaftswoche	HCS (μ g/ml)	HGH (ng/ml)
G. P.	38	13,5	10,8
M. D.	36	12,4	9,0
B. S.	39	7,0	6,6
S. W.	36	11,6	6,6
R.	38	13,1	4,8
C. B.	37	12,8	9,6
B.	34	16,0	12,6
H. M.	36	11,6	6,6
$\bar{x} \pm s$	36,8 $\pm$ 1,5	12,3 $\pm$ 2,4	8,6 $\pm$ 2,5

3.1.4.2.0 Kreuzreaktion mit dem HCS-Antikörper

3.1.4.2.1 Kreuzreaktion mit GHG

Wie aus Abb. 17 zu entnehmen ist, verdrängen etwa 35 ng GHG die gleiche Menge ^{125}J -HCS wie 1 ng HCS aus der HCS-Antikörperbindung. Bei den hohen Verdünnungen, in denen HCS in der Spätschwangerschaft gemessen wird, kann deshalb ein GHG-Effekt auf die HCS-Bestimmung sicher ausgeschlossen werden. Bei einer nicht schwangeren, akromegalen Patientin mit exzessiven GHG-Serumwerten (220 bzw. 193 ng/ml) führte die Kreuzreaktion des GHG mit dem HCS-Antikörper zu einem fiktiven HCS-Wert von 7 ng/ml.

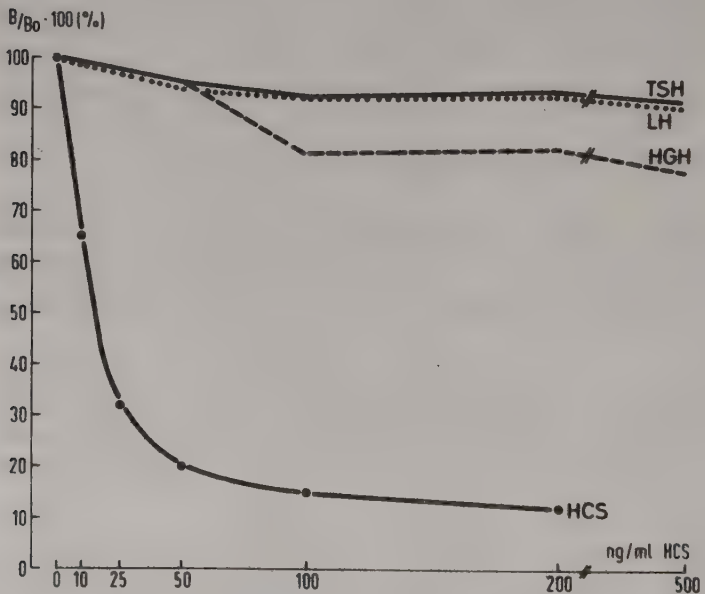


Abb. 17: Kreuzreaktion von GHG, LH und TSH mit dem HCS-Antikörper

3.1.4.2.2 Kreuzreaktion mit TSH und LH

Wie aus Abb. 17 zu entnehmen ist, zeigten TSH und LH keine nennenswerte Kreuzreaktion mit dem HCS-Antikörper.

3.1.4.3.0 Verdünnungskurven im HCS-System

Um den Nachweis der Identität der Immunoreaktivität von HCS-Standardpräparation und Serum-HCS zu führen, verdünnten wir das Serum von 5 schwangeren Patientinnen im letzten Schwangerschaftsdrittel 1:100, 1:200, 1:300 und 1:400. In Tab. 9 sind für jede Verdünnung, die aus ihr berechnete Gesamt-HCS-Konzentration angegeben:

Tab. 9: HCS-Serumspiegel in der Schwangerschaft (bestimmt in verschiedenen Serumverdünnungen)

Serumverdünnung ($\mu\text{g/ml}$)	1:100	1:200	1:300	1:400
Pat. B. (37)	11,0	16,0	11,1	13,2
Pat. R. (38)	9,8	15,0	13,5	14,0
Pat. Br. (38)	-	17,0	15,2	15,9
Pat. M. (36)	9,0	13,0	11,1	13,2
Pat. P. (38)	15,0	16,0	17,4	11,2

Auch hier stellten wir das Ergebnis graphisch dar nach den unter 3.1.1.1. angegebenen Kriterien. Abb. 18 zeigt, daß sich die Verdünnungskurven mit der HCS-Standardkurve decken.

3.1.4.4.0 Verdünnungskurven von Schwangerenserum im HGH-System

Nachdem in Kapitel 3.1.2.1. gezeigt werden konnte, daß HCS-Standard eine deutliche Kreuzreaktion mit dem HGH-Antikörper in den

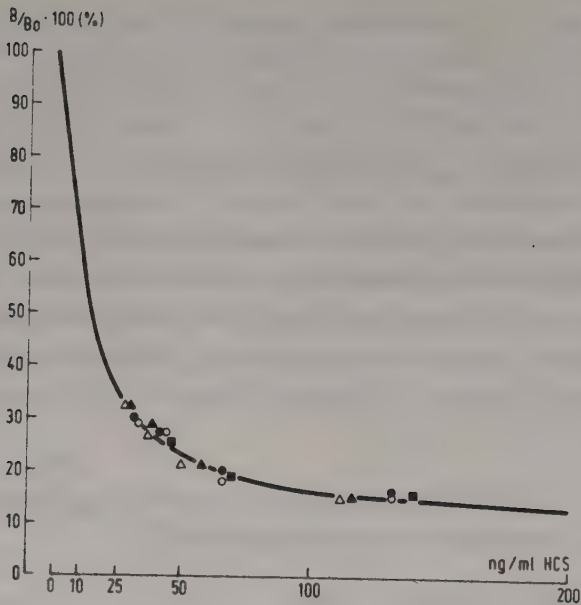


Abb. 18: Immunoidentität des Serum-HCS von Schwangeren mit der HCS-Standardpräparation.
(Δ , $\blacktriangle$, $\bullet$, $\blacksquare$ HCS-Spiegel bei verschiedenen Verdünnungen von 4 Schwangeren im letzten Trimester)

Konzentrationen, die im letzten Schwangerschaftstrimenon vorliegen, zeigt, war es von Interesse, die Immunoreaktivität von endogenem HCS (Schwangerenserum) in unserem HGH-System zu testen.

Die Serumverdünnungen wurden nach dem unter 3.1.1.1. dargestellten Verfahren graphisch wiedergegeben. Weiterhin wurde der Winkel gemessen, den die durch die Logittransformation linearisierte Verdünnungskurve mit der Abszisse bildet.

Tabelle 10 führt die gemessenen Winkel auf.

Tab. 10: Winkel, den die Verdünnungskurven der Schwangerenserren mit der Abszisse bilden

Pat. P.	165°	Pat. B.	166°
Pat. M.	160°	Pat. Sch.	160°
Pat. D.	164°	Pat. R.	163°
Pat. W.	162°	Pat. Br.	164°

In Abb. 19 ist eine Summengerade dargestellt, die zunächst durch den mittleren Anfangspunkt aller Geraden geht und außerdem mit der Abszisse den Winkel von 164° bildet, den Mittelwert aller gemessenen Winkel. Außerdem wurde der Standardfehler der Winkel vom Mittelwert eingetragen (sem = 0,7). Die Standardgerade bildet mit der Abszisse einen Winkel von 146°.

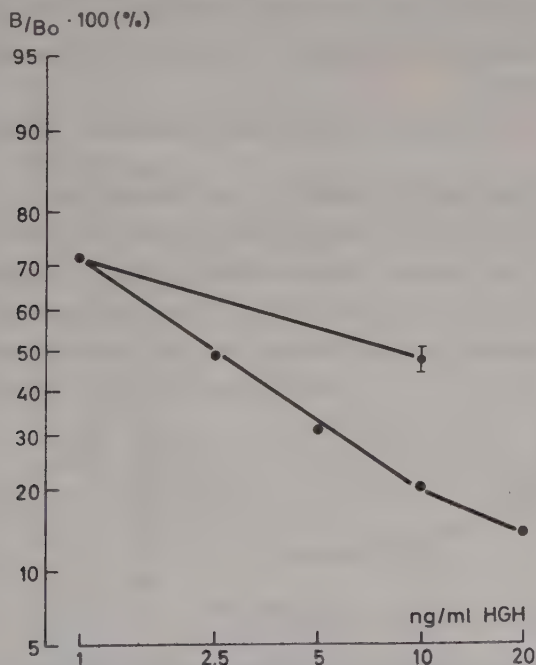


Abb. 19: Kreuzreaktion von endogenem HCS mit dem GHG-Antikörper. Logit-transformierte GHG-Standardkurve (●—●) und davon abweichende Gerade (●—●), die aus acht logit-transformierten Verdünnungskurven von Schwangerenserren resultiert. HCS-Spiegel $12,3 \pm 2,4 \mu\text{g} \pm \text{sem}$

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Winkel und der Serumkonzentration fand sich weder für das gemessene HCS noch für die scheinbare HGH-Konzentration.

3.1.5.0.0 Verdünnungskurven bei der Akromegalie

3.1.5.1.0 Nüchternserum

Von GREENWOOD et al. wird in einem Fall von Akromegalie eine veränderte Immunoreaktivität beschrieben (54). Wir haben 7 akromegale Patienten mit teilweise sehr hohen GH-Nüchternspiegeln untersucht. Wie Abb. 20 zeigt, decken sich die Verdünnungskurven mit der Standardkurve unserer HGH-Präparation.

Als Bezugsstandardkurve wurde in Abb. 20 eine aus vier Tests gemittelte Standardkurve verwendet. Mittelwerte und Standardfehler zeigt Tabelle 11.

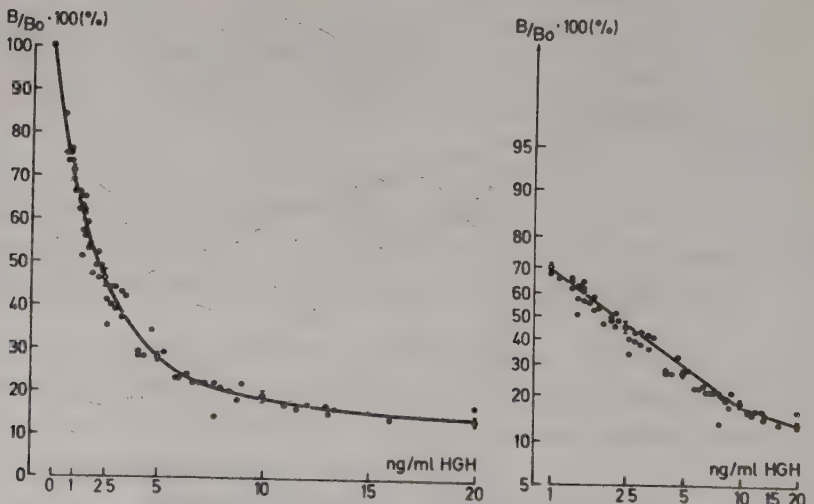


Abb. 20: Immunoidentität von Serum-HGH und Standardpräparationen bei Akromegalie. HGH-Standardkurve, linear und nach Logit-Transformation ($\bar{o} \pm \text{sem}$). Die Punkte (●) resultieren aus Verdünnungen von zehn Seren akromegaler Patienten.

Tab. 11: Mittelwerte und Standardfehler von 4 Standardkurven

HGH-Standard (ng/ml):	1,0	2,5	5,0	10,0	20,0
B/B ₀ (%) $\bar{x}$:	71	46	29	19	14
sem :	1,1	1,9	0,4	0,9	0,2

Bei 2 Patienten mit Akromegalie wurden jeweils die Nüchtern-, 60-Minuten- und 90-Minutenwerte eines Insulinhypoglykämietestes in üblicher Weise verdünnt. Die resultierenden Kurven ergaben für den 90-Minutenwert des IHT einen von der Standardkurve abweichenden Verlauf. Diesen Befund haben wir bei Normalpatienten weiterverfolgt (siehe 3.1.6.).

3.1.5.2.0 Nüchternserum zentral und peripher

Als nächstes untersuchten wir Nüchternseren von akromegalen Patienten, bei denen gleichzeitig aus einer Kubitalvene und aus dem Bulbus cranialis venae jugularis internae nach der unter 2.6. beschriebenen Methode Blut gewonnen wurde. Wie Abb. 21 zeigt, weisen die Nüchternseren, ob peripher oder zentral gewonnen, die gleiche Immunoreaktivität auf.

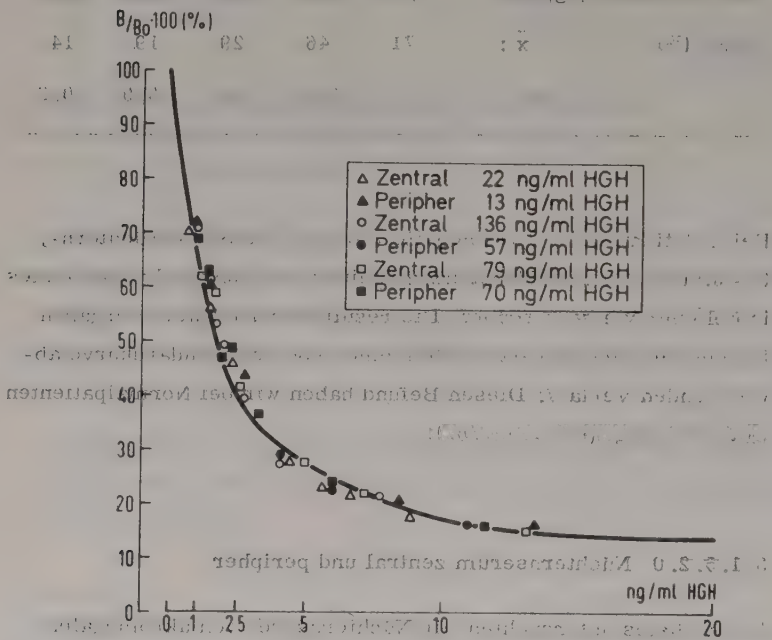


Abb. 21. GHG-Werte bei verschiedenen Serumverdünnungen von drei Patienten mit Akromegalie. Das Serum wurde aus einer Vena cubitalis (= peripher) und dem rechten Bulbus cranialis der Vena jugularis interna gewonnen.

3.1.6.0.0 Verdünnungskurven bei Normalpersonen (IHT)

3.1.6.1.0 Einzelwerte

Bei insgesamt 9 Normalpersonen (Patienten mit normaler GH-Sekretion) wurde ein Insulinhypoglykämietest durchgeführt. Dabei waren die Personen nachträglich ausgesucht worden, da der Anstieg des GHG-Spiegels besonders ausgeprägt sein sollte. (Tab. 12)

Tab. 12: Patienten mit normaler HGH-Sekretion: Insulinhypoglykämietest

Patient	-15 (min)	0 (min)	30 (min)	45 (min)	60 (min)	90 (min)
Nr.	Glukose HGH (mg%) (ng/ml)	Glukose HGH (mg%) (ng/ml)	Glukose HGH (mg%) (ng/ml)	Glukose HGH (mg%) (ng/ml)	Glukose HGH (mg%) (ng/ml)	Glukose HGH (mg%) (ng/ml)
1	- 0,6	83 0,6	85 18,9	36 48	44 70,8	66 65,4
2	89 0,5	89 1,3	32 16	61 -	74 23	84 11
3	92 0	91 0	25 0	33 92	39 87	55 53
4	87 0	92 0	58 19	61 -	78 57	89 30
5	68 8,8	79 3,2	36 36	70 42	- -	75 12,6
6	- 1,2	97 0,1	21 17,4	40 48,6	19 48,6	28 54
7	88 5	87 17,2	55 29	70 51	83 40	90 22
8	91 0,7	91 4,8	40 40,8	57 46,2	73 37,2	87 17,4
9	73 4,8	71 4,8	31 51	38 63	45 46	51 17,9

Verdünnt wurden 30-Minuten, 35-, 45-, 60-, 75- und 90-Minutenwerte. Aus Tabelle 13 sind jeweils die Verdünnung, die gemessene (absolute) HGH-Serumkonzentration und die berechnete (relative) HGH-Serumkonzentration zu entnehmen.

3.1.6.2.0 Mittelwerte

Da nur in einem Fall (Pat. M.) der 30-Minutenwert eine Abweichung vom Kurvenzug des Standards zeigte, faßten wir alle Nüchtern-, 30-, 35-, 40-, 45- und 60-Minutenwerte zusammen und stellten sie den Verdünnungskurven der 90-Minutenwerte gegenüber. Diese Zusammenfassung stellten wir graphisch dar als Regressionsgerade aller Kurvenpunkte. Es waren 78 Punkte.

Die Funktion der Regressionsgeraden:

$$\text{logit } y = -2,22 \log x + 0,76$$

Dazu muß bemerkt werden, daß alle 78 Werte, die aus Tab. 13 zu entnehmen sind, zunächst logit-transformiert werden mußten.

Wie aus Abb. 22 zu entnehmen ist, weicht diese Gerade von der gemittelten Standardkurve vernachlässigbar ab.

In der statistischen Erfassung der acht 90-Minutenwerte (eine Verdünnungskurve mußte ausgeschlossen werden, da sie keine Abweichung vom Standardslope zeigte), gingen wir wie folgt vor: Alle Verdünnungskurven wurden logit-transformiert und der Winkel gemessen, den die resultierende Gerade mit der Abszisse bildete (Tab. 14). Die Abb. 22 zeigt die Gerade, die den mittleren Winkel mit der Abszisse bildet.

b. 13: HGH-Immunoreaktivität im Serum von Normalpersonen

Patient	Blutabnahmezeit	30 Minuten						45 Minuten					
1	Verdünnung	1:11	1:6	1:2	2:1	unv.							
	HGH, gemessen (ng/ml)	1,6	2,5	8,7	11,5	20,0							
	HGH, berechnet (ng/ml)	1,6	2,9	8,8	10,7	17,6							
2	Verdünnung	1:11	1:8	1:6	1:3	1:2	unv.						
	HGH, gemessen (ng/ml)	0,8	1,1	1,5	5,5	7,0	8,0						
	HGH, berechnet (ng/ml)	0,8	1,1	1,5	2,9	4,4	8,8						
3	Verdünnung	1:30	1:20	1:11	1:6	1:2		1:40	1:30	1:20	1:11	1:8	
	HGH, gemessen (ng/ml)	1,3	2,0	3,7	7,4	20,0		2,5	2,7	5,5	8,4	10,8	
	HGH, berechnet (ng/ml)	1,3	2,0	3,5	6,5	19,5		2,5	3,3	5,0	9,1	12,5	
4	Verdünnung	1:11	1:8	1:6	1:4	1:2	unv.*						
	HGH, gemessen (ng/ml)	1,4	2,0	3,1	5,0	12,0	>20						
	HGH, berechnet (ng/ml)	1,4	1,9	2,6	3,8	7,7	15,4						
5	Verdünnung	1:11	1:6	1:4	1:2	2:1	unv.	1:31	1:26	1:21	1:16	1:11	
	HGH, gemessen (ng/ml)	0,8	1,7	2,2	4,7	6,5	11,3	1,0	1,2	1,4	2,2	3,3	
	HGH, berechnet (ng/ml)	0,8	1,5	2,2	4,4	5,9	8,8	1,0	1,2	1,5	1,9	2,8	
6	Verdünnung	1:8	1:6	1:4	1:2	2:1	unv.						
	HGH, gemessen (ng/ml)	1,7	2,4	3,9	7,8	7,8	15,0						
	HGH, berechnet (ng/ml)	1,7	2,3	3,4	6,8	9,1	13,6						
7	Verdünnung							1:40	1:30	1:20	1:11	1:6	
	HGH, gemessen (ng/ml)							0,7	0,9	1,4	3,6	>20	
	HGH, berechnet (ng/ml)							0,7	0,9	1,4	2,6	4,7	
8	Verdünnung	1:31	1:21	1:11	1:8	1:6	1:3	1:2	1:41	1:31	1:21	1:11	1:8
	HGH, gemessen (ng/ml)	1,3	1,9	3,4	4,3	5,0	13,5	>20	1,0	1,1	1,6	3,4	4,8
	HGH, berechnet (ng/ml)	1,3	1,9	3,7	5,0	6,7	13,4	20	1,0	1,3	2,0	3,7	5,1
9	Verdünnung							1:31	1:21	1:16	1:11	1:5	
	HGH, gemessen (ng/ml)							2,0	3,2	4,2	6,7	16,0	
	HGH, berechnet (ng/ml)							2,0	2,9	3,9	5,6	12,4	

* = 35 Minuten

** = 75 Minuten

	60 Minuten							90 Minuten						
	1:41	1:31	1:21	1:11	1:6			1:41	1:31	1:21	1:11	1:6		
	1,4	1,7	2,6	4,8	8,3			1,3	3,1	5,3	8,9	>20		
	1,4	1,9	2,7	5,2	9,5			1,3	1,7	2,5	4,9	8,9		
	1:21	1:16	1:11	1:8	1:6	1:2	*** unv.	1:11	1:6	1:3	1:2	2:1	3:1	unv.
	0,5	0,6	0,9	1,2	1,7	8,8	13,0	0,8	1,4	3,8	6,6	11,3	15,0	>20
	0,5	0,6	0,9	1,2	1,7	4,9	9,9	0,8	1,5	2,9	4,4	5,9	6,6	8,8
								1:20	1:11	1:8	1:6	1:2		
								2,0	3,3	5,8	10,0	>20		
								2,0	3,6	5,0	6,7	20		
	1:31	1:21	1:16	1:11	1:6	1:2		1:21	1:11	1:6	1:4	1:2		
	1,7	2,5	3,6	5,0	10,0	>20		1,7	3,0	5,9	19,5	>20		
	1,7	2,5	3,3	4,8	8,8	26,3		1,7	3,2	5,9	8,9	17,9		
1:6	1:2							1:11	1:6	1:4	1:2	2:1	unv.	
5,3	>20							0,9	1,8	2,6	6,6	11,3	>20	
5,2	15,5							0,9	1,7	2,4	4,9	6,6	9,9	
	1:30	1:20	1:11	1:6	1:3	1:2		1:40	1:30	1:20	1:11	1:6	1:4	
	1,3	1,9	4,0	4,5	12,4	>20		1,6	2,0	3,1	5,0	10,0	16	
	1,3	2,0	3,6	6,5	13,0	19,5		1,6	2,1	3,2	5,8	13,0	16	
1:2								1:20	1:11	1:6	1:2	2:1	unv.	
>20								0,8	1,5	2,6	9,0	14,5	>20	
14,0								0,8	1,5	2,7	8,6	10,5	16,0	
1:6	1:3							1:16	1:11	1:6	1:3	1:2	2:1	unv.
6,0	15,0							0,8	1,1	2,0	4,3	7,2	9,5	>20
6,8	13,7							0,8	1,2	2,1	4,2	6,4	8,6	12,
1:3								1:16	1:11	1:6	1:2			
>20	1,3	1,9	2,5	4,0	7,3	>20		0,8	1,0	2,0	10,0			
20	1,3	1,9	2,5	3,7	6,7	21		0,8	1,2	2,1	6,4			

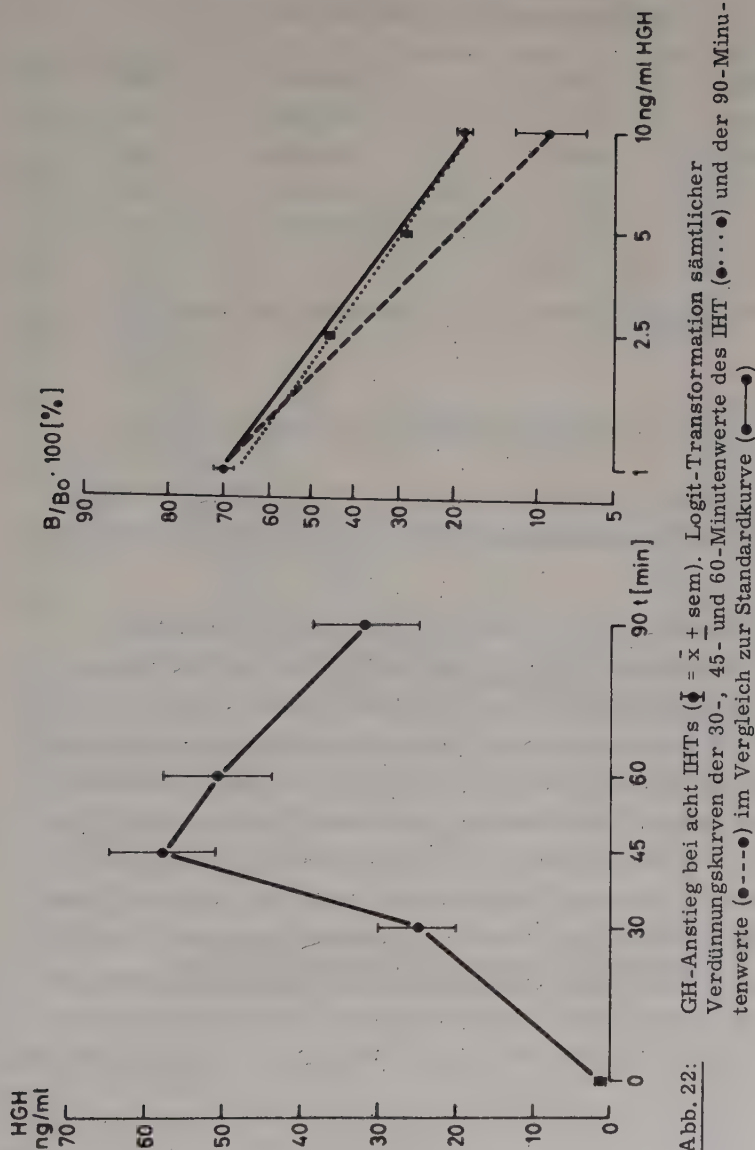


Abb. 22:

GH-Anstieg bei acht IHTs ($\bar{I} = \bar{x} + \text{sem}$). Logit-Transformation sämtlicher

Verdünnungskurven der 30-, 45- und 60-Minutenwerte des IHT ($\bullet \cdots \bullet$) und der 90-Minutenwerte ($\bullet \cdots \bullet$) im Vergleich zur Standardkurve ($\bullet \cdots \bullet$)

Tab. 14: Winkel der linearisierten Verdünnungskurven des 90-Minutenwertes mit der Abszisse

Pat. D.	126°	Pat. Pl.	140°
Pat. Pf.	139°	Pat. M.	141°
Pat. E.	139°	Pat. Sch.	137°
Pat. F.	143°	Pat. A.	146°

$$\bar{x} = 139^{\circ}; \quad \text{sem} = 1,95^{\circ}$$

Die Standardgerade bildet mit der Abszisse einen Winkel von 147°.

3.1.6.3.0 Darstellungsmöglichkeiten der Verdünnungskurve

Am Beispiel des 90-Minutenwertes der Patientin Nr. 5 sollen die möglichen Darstellungsweisen der Verdünnungskurve gezeigt werden.

Wie in Kapitel 3.1.1.1. berichtet, entstanden die berechneten GH-Serumkonzentrationen durch Multiplikation des Verdünnungsfaktors mit einer am steilen Teil der Standardkurve (nahe 1 ng/ml HGH-Standardkonzentration) gemessenen GH-Serumkonzentration. Selbstverständlich könnte man jeden Punkt der Verdünnungskurve als Bezugspunkt verwenden, d.h. aus dem Produkt von B/B_0 (%) und dem Verdünnungsfaktor die GH-Konzentration des unverdünnten Serums ermitteln. Rückschließend kann man aus dieser Größe die GH-Konzentration aller übrigen Verdünnungen berechnen und die gemessenen B/B_0 (%) als Funktion dieser Konzentrationen auftragen. Daraus ergibt sich eine Schar parallel verschobener Kurven, die die Standardkurve in ihrem Bezugspunkt schneiden (Abb. 23).

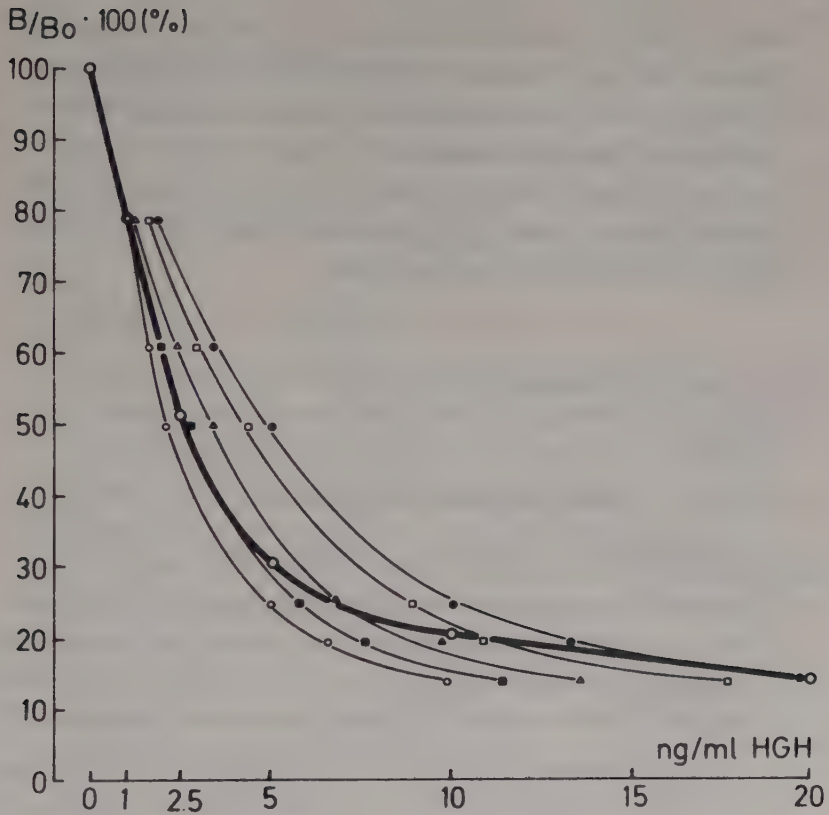


Abb. 23: Schar von Verdünnungskurven des gleichen Serums. Jede Verdünnungskurve schneidet die Eichkurve in ihrem Bezugspunkt (Erklärung siehe 3. 1. 6. 3.)

3.2.0.0.0 Vergleichende Bestimmungen:

Vena cubitalis - Bulbus cranialis venae jugularis

Nach der in 2.6. beschriebenen Methode wurden an 3 Akromegalie-Patienten und an 7 Patienten ohne Akromegalie vergleichende Untersuchungen der Plasmakonzentrationen von GH, LH und TSH angestellt. Die Plasmakonzentrationen im Bulbus cranialis venae jugularis werden im folgenden zentral, die in der Vena cubitalis peripher genannt. In der Peripherie wurden zusätzlich Blutglukose, freie Fettsäuren und Cortisol gemessen.

3.2.1.0.0 Akromegalie

Ergebnisse

3.2.1.1.0 Zentral-periphere HGH-Differenz

1) Patientin K. W., 68 Jahre alt, 160 cm, 52 kg

Bei der Patientin fanden sich erhöhte GH-Spiegel, die im oralen Glukosetoleranztest nicht supprimierbar waren. Im Verlauf einer Strumaresektion wurde gleichzeitig aus einer Kubitalvene und dem cranialen Anteil der venae jugularis internae Blut entnommen.

Die HGH-Serumwerte waren:	Zentral	16,8 ng/ml
	Peripher	8,8 ng/ml

Der Quotient Zentral/Peripher betrug 1,9.

2) Patientin J. G., 35 Jahre alt, 172 cm, 72 kg

Klinisch manifeste Akromegalie mit hohen GH-Nüchternspiegeln, die durch Insulin- und Argininstimulation nicht mehr zu steigern waren. Durch die orale Glukose-Belastung erfolgte keine Suppression der GH-Spiegel.

15 Minuten nach erfolgter Einführung des Katheters in den Bulbus wurde die erste Blutprobe (1) entnommen und nach weiteren 10 Minuten die zweite (2).

		(1)	(2)
GH-Nüchternspiegel:	zentral:	136 ng/ml	117 ng/ml
	peripher:	57 ng/ml	54 ng/ml
Quotient: Zentral/Peripher		2,4	2,17
LH-Nüchternspiegel:	zentral:	2,9 ng/ml	2,7 ng/ml
	peripher:	0,5 ng/ml	2,4 ng/ml
TSH-Nüchternspiegel:	zentral:	3,2 E/ml	2,8 E/ml
	peripher:	2,9 E/ml	2,5 E/ml

3) Patientin I. B., 36 Jahre alt, 156 cm, 47,2 kg

Die klinische Diagnose Akromegalie wurde verifiziert durch die Messung des Wachstumshormons: Die Nüchternwerte waren eindeutig erhöht (103 ng/ml). Die GH-Sekretion war durch Insulinhypoglykämie und Arginininfusion stimulierbar. Im oralen Glukosetoleranztest erfolgte ein paradoxer GH-Anstieg.

Die etwa 15 Minuten nach der Einführung des Jugulariskatheters erfolgten Blutabnahmen ergaben folgende Nüchtern-GH-Spiegel:

zentral:	79 ng/ml
peripher:	70 ng/ml

Der Quotient Zentral/Peripher betrug: 1,12

In diesem Fall konnte aus technischen Gründen der Katheter nicht bis zum Bulbus vorgeschoben werden.

Plasma-LH:	zentral:	3,5 ng/ml	peripher:	2,7 ng/ml
Plasma-TSH:	zentral:	3,7 μ E/ml	peripher:	2,7 μ E/ml

3.2.1.2.0 Biologische Halbwertszeit des HGH

Wie unter anderem von P. C. SCRIBA (134) für das ACTH angegeben wurde, kann man auch beim HGH aus der zentral-peripheren Differenz eine Berechnung der biologischen Halbwertszeit versuchen.

Patient	HGH (ng/ml)		Quo- tient	Insulinhypoglykämie			Argininbelastung			OGTT		
	zen- tral	peri- pher		Zeit	Glukose (mg%)	HGH (ng/ml)	Zeit	Glukose (mg%)	HGH (ng/ml)	Zeit	Glukose (mg%)	HGH (ng/ml)
K. W., 68 a; 52 kg, 160 cm Akromegalie	16, 8	8, 8	1, 9							0' 60'	99 213	14, 7 14, 4
J. G., 35 a; 73 kg, 164 cm Akromegalie	136 117	57 54	2, 4 2, 16	N ₁ N ₂ 30' 45' 60' 90'	107 87 51 54 53 68	>120 >120 96 101 89 78				0' 60'	92 194	68, 4 65, 4
I. B., 36 a; 47, 2 kg, 156 cm Akromegalie	79	70	1, 12	N ₁ N ₂ 30' 45' 60' 90'	94 91 46 33 66 78	103 80 69 171 112 110	N ₁ N ₂ 30' 60' 90' 120'	117 101 123 112 90 89	103 77 133 107 110 79	0' 60'	89, 1 182, 2	86, 4 120

Tab. 15: Jugulariskatheter bei Patienten mit Akromegalie

Diese erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Halbwertszeit} = \frac{[\text{HGH}]_{\text{peripher}} \cdot \text{Verteilungsvolumen} \cdot 0,5}{([\text{HGH}]_{\text{zentral}} - [\text{HGH}]_{\text{peripher}}) \cdot 800 \cdot \frac{100 - \text{Hämatokrit}}{100}} \quad [\text{min}]$$

Als Verteilungsvolumen des HGH wird von PARKER et al. (115) 15 % des Körpergewichts in Liter angegeben.

Als mittleren Hämatokrit verwendeten wir 45 % (134).

800 = Hirndurchblutung in ml/min nach KETY und SCHMIDT (74).

Für Patientin K. W. gilt:

$$\text{HWZ} = \frac{8,8 \cdot 7800 \cdot 0,5}{8 \cdot 800 \cdot 0,55} = 8,67 \text{ (min)}$$

Für Patientin J. G. gilt:

$$\text{HWZ}_1 = \frac{57 \cdot 10800 \cdot 0,5}{79 \cdot 800 \cdot 0,55} = 9,72 \text{ (min)}$$

$$\text{HWZ}_2 = \frac{54 \cdot 10800 \cdot 0,5}{63 \cdot 800 \cdot 0,55} = 11,5 \text{ (min)}$$

Für Patientin I. B. ließ sich auf Grund technischer Schwierigkeiten keine wirkliche zentrale HGH-Konzentration ermitteln.

3.2.2.0.0 Patienten mit normalem GH-Nüchternspiegel

Diese Patientengruppe bestand aus 5 Patienten mit ausgeprägter Adipositas, mit einem mittleren Übergewicht von 83 % bezogen auf das Durchschnittsgewicht (Geigy-Tabellen). Die Extremwerte waren 51 % und 147 % Übergewicht (2 männliche und 3 weibliche Patienten, Durchschnittsalter von 24,4 Jahren (15 Jahre - 36 Jahre)). In dieses Kollektiv nahmen wir weiter eine Patientin mit idiopathischem Hirsutismus (22 Jahre, 10 % Übergewicht) und eine Patientin mit Anorexia mentalis (31 Jahre, 26 % Untergewicht) auf.

Etwa 15 Minuten nach dem der Katheter in den Bulbus cranialis venae jugularis gelegt war, wurde mit der Durchführung des unter 2. 5. beschriebenen Insulinhypoglykämietestes begonnen. In der Peripherie wurden Glukose, Freie Fettsäuren und Cortisol bestimmt. Peripher und zentral wurden GH, TSH und LH gemessen. Die Ergebnisse für die einzelnen Patienten sind dargestellt in Tab. 16. Die Zusammenfassung aller Werte erfolgt in Abb. 24.

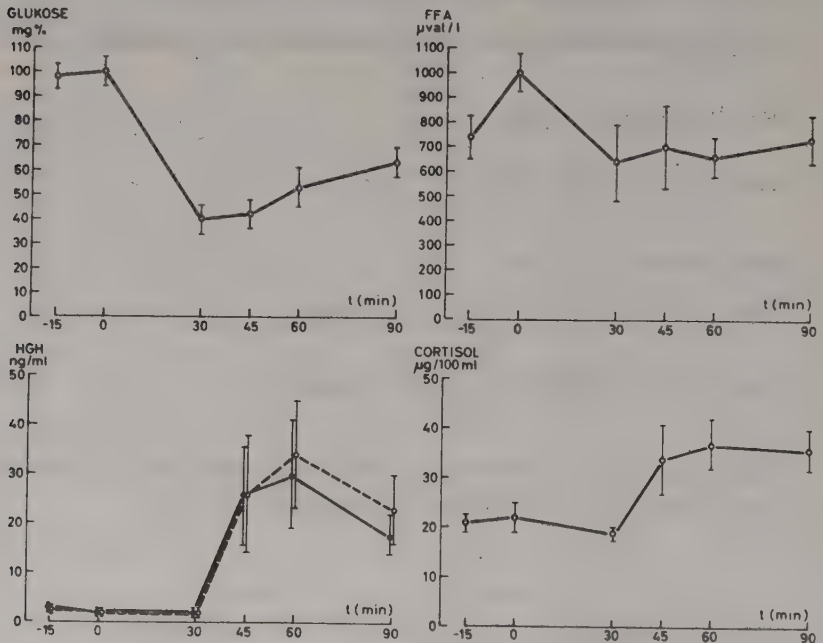


Abb. 24:

Vergleichende Messung von GH in einer Vena cubitalis und dem rechten Bulbus cranialis der vena jugularis interna bei 5 Normalpatienten im Verlauf eines Insulinhypoglykämietestes.

Glukose, FFA und Cortisol wurden nur in der Vena cubitalis gemessen.

●—● GH-Spiegel im Bulbus cranialis der vena jugularis interna

o---o GH-Spiegel in einer Vena cubitalis

Tab. 16: Jugulariskatheter bei Personen mit normaler HVL-Funktion
(m = männlich; f = weiblich; z = zentral; p = peripher)

Patient	Insulinhypoglykämietest	N ₁		N ₂		30'		45'		60'		90'	
		z	p	z	p	z	p	z	p	z	p	z	p
K. (m) 15 a; 173 cm; 99 kg	Blutglukose (mg/100 ml)		92		100		36		55		59		59
	Serum-FFA (μval/l)		577		831		352		358		361		385
	Serum-Cortisol (μg/100 ml)		17		16		19		22		-		36
	Serum-HGH (ng/ml)	5,4	3,6	4,8	1,8	2,4	0,6	3,6	3,6	6,6	7,8	7,8	9,6
	Serum-LH (ng/ml)	1,5	1,5										
	Serum-TSH (μE/ml)	2,3	2,9	2,3	3,3	2,3	2,6	1,5	2,1	1,0	2,0	1,7	0,7
B. (f) 33 a; 164 cm; 92 kg	Blutglukose (mg/100 ml)		85		82		13		18		28		50
	Serum-FFA (μval/l)		564		1250		935		-		565		584
	Serum-Cortisol (μg/100 ml)		25		26		18		-		37		36
	Serum-HGH (ng/ml)	1,6	1,8	1,2	0	1,2	0	4,8	14,4	16,2	24,0	35,4	30
	Serum-LH (ng/ml)	3	2,5										
	Serum-TSH (μE/ml)	1,5	1,0	1,2	2,3	1,1	1,5	1,4	1,4	1,0	0,9	0,8	1,3

Tab. 16: Fortsetzung

Patient	Insulinhypoglykämietest	N ₁		N ₂		30'		45'		60'		90'	
G. (m)		z	p	z	p	z	p	z	p	z	p	z	p
22 a;	Blutglukose (mg/100 ml)		114		124		63		58		86		92
180 cm;	Serum-FFA (µval/l)		517		1313		1568.		1536		926		1119
105 kg	Serum-Cortisol (µg/100 ml)		21		17		15		-		21		20
	Serum-HGH (ng/ml)	1,8	1,8	1,8	1,8	0,6	2,4	1,5	-	27,6	27,6	12,6	19,8
	Serum-LH (ng/ml)	4,9	5,0										
	Serum-TSH (µE/ml)	3,4	3,1	2,8	2,9	2,5	2,8	2,4	-	2,5	2,5	2,3	2,3
M. (f)	Blutglukose (mg/100 ml)		94		97		45		37		41		44
36 a;	Serum-FFA (µval/l)		643		741		505		555		603		637
162 cm;	Serum-Cortisol (µg/100 ml)		23		25		20		26		30		35
120 kg	Serum-HGH (ng/ml)	5,4	3,6	2,4	4,2	3,0	5,4	38,4	36,0	48	45	18,6	24
	Serum-LH (ng/ml)	6,8	7,6										
	Serum-TSH (µE/ml)	2,1	1,9	1,7	1,6	2,1	1,6	2,2	1,9	1,6	2,7	1,5	3,3

Tab. 16: Fortsetzung

Patient	Insulinhypoglykämietest	N ₁		N ₂		30'		45'		60'		90'	
		z	p	z	p	z	p	z	p	z	p	z	p
K. (f) 16 a; 174 cm; 151 kg													
	Blutglukose (mg/100 ml)		121		122		56		50		62		84
	Serum-FFA (μval/l)		1015		1066		536		574		603		657
	Serum-Cortisol (μg/100 ml)		18		17		16		19		28		28
	Serum-HGH (ng/ml)	3,6	5,4	3,6	3,0	1,8	2,4	2,1	3,6	9,6	13,8	7,2	3,0
	Serum-LH (ng/ml)	6,3	6,2										
B. (f) 22 a; 170 cm; 66 kg	Serum-TSH (μE/ml)	2,3	2,9	2,5	2,7	2,3	-	2,2	2,1	1,9	2,1	0	0
	Blutglukose (mg/100 ml)		91		87		44		261		152		54
	Serum-FFA (μval/l)		1174		810		267		375		89		98
	Serum-Cortisol (μg/100 ml)		15,9		16,5		26,4		50,1		60,1		53
	Serum-HGH (ng/ml)	1,8	1,8	1,8	1,8	7,2	3,5	10,0	5,0	17	-	16	-
	Serum-LH (ng/ml)	-	-										
	Serum-TSH (μE/ml)	2,7	3,0	1,6	1,9	-	-	2,1	2,7	3,1	-	-	-

Tab. 16: Fortsetzung

Patient	Insulinhypoglykämietest	N ₁		N ₂		30'		45'		60'		90'	
		z	p	z	p	z	p	z	p	z	p	z	p
E. (f) 31 a; 158 cm; 42,4 kg	Blutglukose (mg/100 ml)		92		91		25		33		39		55
	Serum-FFA (μval/l)		683		1008		299		837		910		994
	Serum-Cortisol (μg/100 ml)		26,2		36,4		19,4		53,8		44,0		46,6
	Serum-HGH (ng/ml)	0	0	0	0	0	0	88	92	87	87	30	53
	Serum-LH (ng/ml)	11	10,5										
	Serum-TSH (μE/ml)	1,4	1,6	1,3	1,8	1,6	1,4	1,7	0,9	1,2	0,9	0,9	0

3.3.0.0 Forbes-Albright-Syndrom

Seit der Entwicklung spezifischer Radioimmunoassays für humanes Prolaktin weiß man, daß eine Galaktorrhoe durch vermehrte Prolaktinsekretion hervorgerufen ist (52). Wie wir in Kapitel

3.1.3.1. zeigen konnten, führt das Prolaktin zu keiner Kreuzreaktion im HGH-System, d.h. Prolaktin ist zumindest immunologisch verschieden von HGH. Dieses untersuchte Serum mit dem erhöhten Prolaktinspiegel stammte von einer Patientin mit Forbes-Albright-Syndrom (20, 95, 120), das durch folgende Symptomentrias gekennzeichnet ist: Hypophysentumor, nicht-puerperale Galaktorrhoe und Amenorrhoe.

3.3.1.0.0 Kasuistik

3.3.1.1.0 Anamnese und Verlauf

Die 34-jährige Patientin wies eine unauffällige Familienanamnese auf und war selbst nie ernstlich krank. 1948 Menarche, der regelmäßige Periodenblutungen folgten (28/4). 1952 kam es erst zur Oligomenorrhoe und schließlich zur sekundären Amenorrhoe, die bis heute fortbesteht. Mit 28 Jahren (1965) bemerkte sie erstmals eine Milchsekretion aus beiden Mammae und 1969 traten Kopfschmerzen auf (Stirn, Schläfe und Hinterkopf). Es wurde eine Gesichtsfeldeinschränkung rechtstemporal festgestellt, worauf 1971 eine Röntgenaufnahme des Schädels veranlaßt wurde, die den Verdacht auf einen Hypophysentumor bestätigte.

Am 16. 6. 71 erfolgte die Einweisung in die II. Medizinische Universitätsklinik München zur endokrinologischen Durchuntersuchung. Am 7. 7. 71 wurde in der Neurochirurgischen Klinik der Universität München nach rechtsfrontaler Trepanation ein über die Sella hinausragender Tumor entfernt.

Da die Galaktorrhoe nach der Operation fortbestand, wurde der

Prolaktininhibitor CB 154 (Sandoz, Basel) versucht. Die Patientin hatte aber weiterhin stark erhöhte Prolaktinserumspiegel (Tab. 22), so daß am 17. 4. 72 in der Neurochirurgischen Klinik der Universität München eine transsphenoidale Kryohypophysektomie durchgeführt wurde. Dabei konnte ein Tumorrest am Sella-boden entfernt werden. Die Milchsekretion nahm in der Folgezeit nur geringfügig ab.

3. 3. 1. 2. 0 Befunde bei Aufnahme und während des Verlaufs

3. 3. 1. 2. 1 Klinische Befunde

Die 34-jährige Patientin (95 kg, 160 cm) zeigt Milchsekretion beider Mammae. Das Genitale ist unauffällig, der Uterus klein. Das Gesichtsfeld ist rechtstemporal eingeschränkt. Im übrigen ist die internistische und neurologische Untersuchung unauffällig.

3. 3. 1. 2. 2 Röntgenaufnahme des Schädels

Es findet sich eine deutlich erweiterte Sella turcica mit subtotaler Druckusurierung des Dorsum sellae und Druckusurierung am Clivus. Die Luftdarstellung der basalen Zisternen ergibt eine Anhebung der Cisterna opticochiasmatica, die einer suprasellären Ausdehnung des Tumors entspricht.

3. 3. 1. 2. 3 Allgemeine Laboruntersuchungen

Blutbild, Urinstatus und Blutchemie sind unauffällig.

Cholesterin	384 mg%
Gesamtlipide	1060 mg%
T ₃ -Test	30,4 %

PBI wegen der Kontrastmitteldarstellung nicht zu verwerten.

3.3.1.2.4 ACTH-Test

Zur Funktionsdiagnostik der Hypophysen-Nebennieren-Achse wurden Serumcortisol, 17-KS- und 17-OHCS im Urin vor und nach ACTH-Stimulation (25 I. E. ACTH in 4 Std.) gemessen.

Tab. 17: Corticosteroide, Basalsekretion und nach Stimulation im Urin und im Serum

	17-KS (mg/24 Std.)	17-OHCS (mg/24 Std.)	11-OHCS (µg/100 ml)
<u>Präoperativ:</u>			
basal:	12,5	5,8	9 ⁰⁰ : 23
nach Stimulation:	20,1	10,9	13 ⁰⁰ : 38
<u>nach der 1. Operation:</u>			
basal:	8,2	4,5	9 ⁰⁰ : 17
nach Stimulation:	10,4	10,8	13 ⁰⁰ : 57
<u>nach der 2. Operation:</u>			
basal:	15,6	4,3	9 ⁰⁰ : 15
nach Stimulation:	16,7	10,7	13 ⁰⁰ : 52

Die ACTH-Sekretion war nicht gestört (siehe Diskussion).

3.3.1.2.5 LH im Urin und Serum⁺⁾

Es wurde die LH-Sekretion gemessen vor und nach Stimulation mit Clomifen bzw. LH-Releasing-Faktor. Methode siehe A. SOUVAT-ZOGLU (135a).

⁺⁾ Für die Bestimmung der LH-Werte danken wir Herrn Priv. Doz. Dr. A. Souvatzoglou.

Tab. 18: LH im 24-Std.-Urin (I. E.) vor und nach Clomifen-stimulation und im Serum nach Stimulation mit LH-Releasing-Faktor (LRF)

	basal (I. E. /24 Std.)			nach 5x150 mg Clo- mifen (I. E. /24 Std.)		
	1. Tag	2. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag
<u>Präoperativ:</u>	<10,6	<10,6	<10,6	32	128	<10,6
<u>n. d. 1. Operation:</u>	<10,6	<10,6	<10,6	64	32	32
<u>n. d. 2. Operation:</u>	LRF-Test (Serum-LH in ng/ml)					
Blutabnahmezeit:		Nüchtern	20(min)	30(min)	40(min)	
LH (ng/ml):		2,1	1,8	3,0	2,7	

Die LH-Sekretion war in allen Fällen eindeutig vermindert (siehe Diskussion).

3. 3. 1. 2. 6 Stimulation der TSH-Sekretion mit Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH)⁺)

Die Methodik des TRH-Testes ist bei PICKARDT et al. (116a) beschrieben.

TSH-Basalsekretion	2,3 (µE/ml)
nach 30 Minuten	14,1 (µE/ml)
nach 120 Minuten	5,3 (µE/ml)
nach 240 Minuten	4,1 (µE/ml)

Δ TSH: 11,8

Der TRH-Test war normal (siehe Diskussion)..

⁺) Für die Durchführung des TRH-Testes und die Bestimmung der TSH-Werte danken wir Frau Priv. Doz. Dr. Pickardt und Herrn Dr. Dr. Erhard.

3.3.1.2.7 Insulinhypoglykämietest

Durch diesen in Kapitel 2.5. beschriebenen Test ist es möglich, sowohl die HGH- als indirekt auch die ACTH-Sekretionsreserve der Hypophyse zu bestimmen. Das Ergebnis zeigen Abb. 25 und Tab. 19.

Tab. 19: Insulinhypoglykämietest (Glukose, HGH und 11-OHCS im Serum)

Blutabnahmezeiten (min)	-15	0	30	45	60	90
<u>Präoperativ:</u>						
Glukose (mg/100 ml)	94	95	55	-	72	77
HGH (ng/ml)	3,6	3,0	3,0	-	5,4	5,4
11-OHCS (µg/100 ml)	19	19	24	-	25	23
<u>nach der 1. Operation:</u>						
Glukose (mg/100 ml)	88	97	55	45	60	65
HGH (ng/ml)	1,8	1,2	1,8	6,6	7,2	5,4
11-OHCS (µg/100 ml)	17	16	13	18	32	32
<u>nach der 2. Operation:</u>						
Glukose (mg/100 ml)	97	101	74	47	51	60
HGH (ng/ml)	5,5	6,7	3,6	7,8	6,0	7,5
11-OHCS (µg/ml)	15	11	11	23	29	34

Die HGH-Sekretion war vor und nach den Operationen eindeutig vermindert, während die Cortisolsekretion im Normalbereich lag (siehe Diskussion). (Normalkollektiv siehe Kapitel 3.3.2.)

3.3.1.2.8 Argininbelastung

Wie aus Abb. 26 und Tab. 20 zu entnehmen ist, erfolgt auch nach Argininstimulation kein regelrechter Anstieg des HGH-Spiegels.

Die gleichzeitige Messung des Insulinspiegels dokumentiert den durch die Adipositas hervorgerufenen Insulinantagonismus, den das Pankreas durch eine maximale Insulinsekretion zu kompensieren versucht.

Tab. 20: Argininbelastung (Glukose, HGH und Insulin im Serum)

(min)	-15	0	30	60	90	120
<u>präoperativ:</u>						
Glukose (mg/100 ml)	97	96	132	126	115	70
HGH (ng/ml)	3,0	3,0	3,0	4,2	3,0	3,6
Insulin (μ U/ml)	-	57	200	148	70	49
<u>nach der 1. Operation:</u>						
Glukose (mg/100 ml)	92	-	119	103	-	76
HGH (ng/ml)	-	1,2	1,2	6,6	3,0	0,7
Insulin (μ U/ml)	29,5	28	200	110	34	15,5
<u>nach der 2. Operation:</u>						
Glukose (mg/100 ml)	96	93	112	111	107	107
HGH (ng/ml)	3,4	3,8	5,1	9,0	2,0	1,5

Für die Bestimmung der Insulinspiegel danken wir Frl. Ermler (Labor Dr. Bottermann).

Für die übergewichtige Patientin ist die Insulinsekretion nicht ausreichend, was den pathologischen Glukosetoleranztest im folgenden erklärt.

3.3.1.2.9 Oraler Glukosetoleranztest

Dieser Test wurde nach der Vorschrift in Kapitel 2.8. durchgeführt. Wie aus Tab. 21 zu entnehmen ist, bleibt die pathologische Glukosetoleranz auch nach der Operation fortbestehen. HGH steigt in paradoxer Weise leicht an.

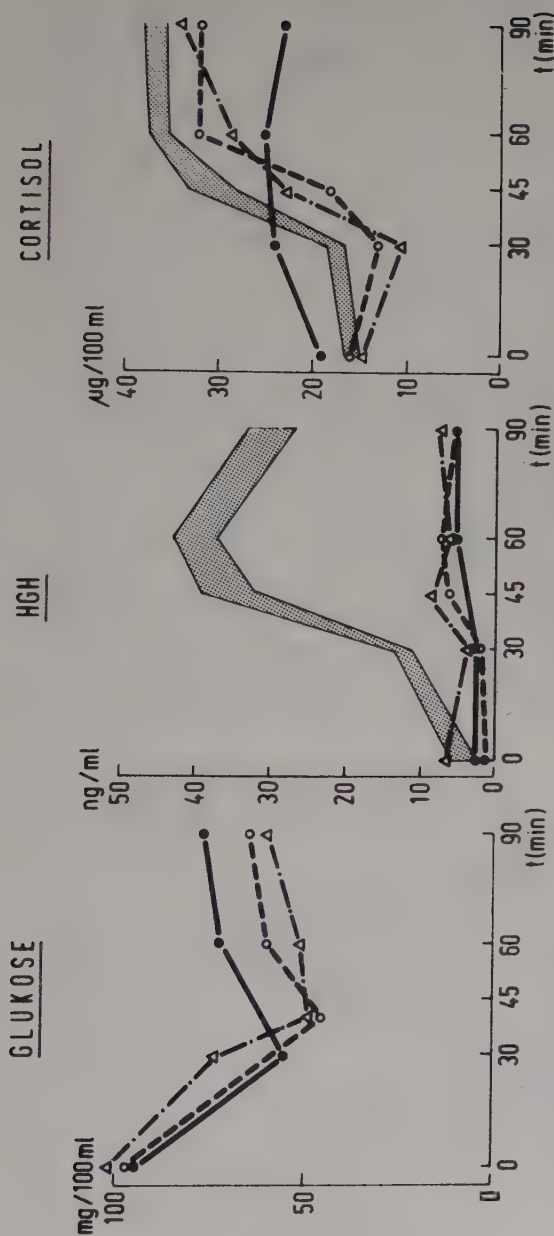


Abb. 25: Insulinhypoglykämietest bei einer Patientin mit Forbes-Albright-Syndrom. Glukose, HGH und Cortisol im Serum vor (●—●) und nach (○—○) der transfrontalen Hypophysektomie und nach der transphenoidalen Hypophysektomie (Δ—Δ). Schraffiert der Normalanstieg von HGH und Cortisol ($\bar{x} \pm \text{sem}$) (siehe 3. 3. 2.)

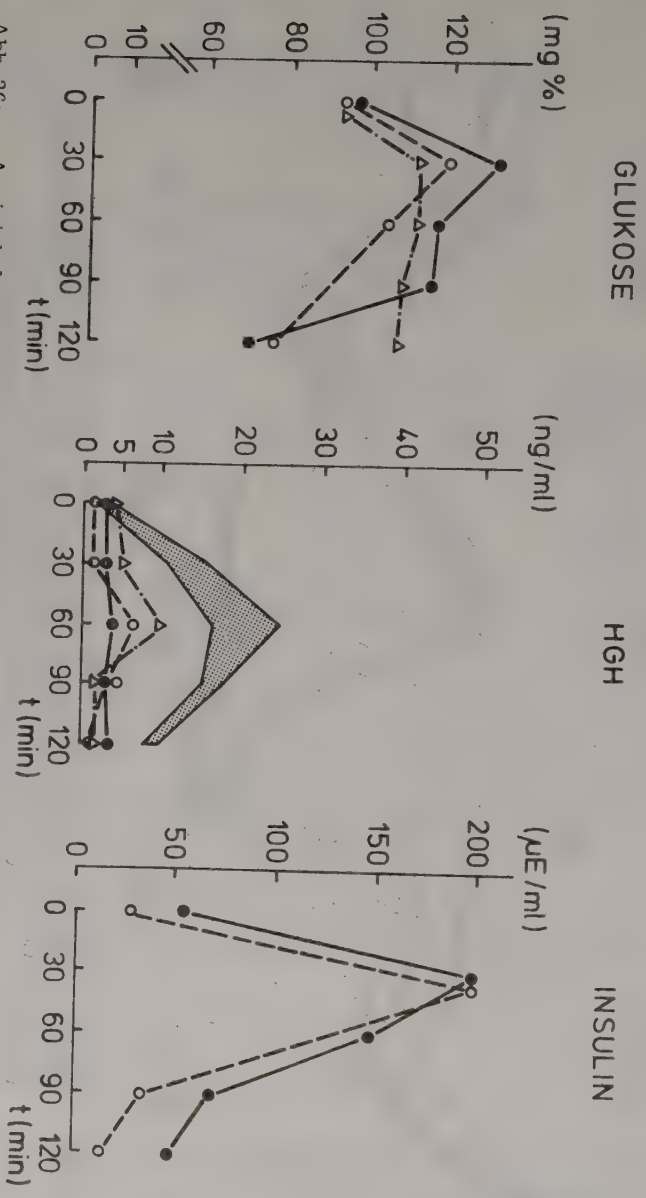


Abb. 26: Argininbelastung bei einer Patientin mit Forbes-Albright-Syndrom: Glukose, HGH und Insulin im Serum. (Erklärung der Symbole Abb. 25). Die schraffierte Fläche entspricht dem Normalverlauf des HGH-Anstiegs bei der Argininbelastung ($\bar{x} \pm \text{sem}$) (siehe 3. 3. 2.)

Tab. 21: Oraler Glukose-Toleranz-Test (Glukose, HGH)

Abnahmezeit (min)	0	60	120	180
<u>präoperativ:</u>				
Glukose (mg/100 ml)	103	231	233	126
HGH (ng/ml)	0,6	2,5	-	-
<u>nach der 1. Operation:</u>				
Glukose (mg/100 ml)	96	231	234	109
HGH (ng/ml)	0,4	2,7	-	-
<u>nach der 2. Operation:</u>				
Glukose (mg/100 ml)	90	222	213	96
HGH (ng/ml)	2,3	4,2	-	-

3.3.1.2.10 Prolaktin

Freundlicherweise wurden uns von Dr. Friesen, McGill-Universität, Montreal, die Prolaktinspiegel gemessen. Diese lagen weit über dem normalen Prolaktinspiegel von weniger als 25 ng/ml.

Tab. 22: Prolaktinspiegel (ng/ml)

präoperativ:	OGTT:	0 (min)	3 200 (ng/ml)
		60 (min)	3 400 (ng/ml)
	Nüchternspiegel	9 ⁰⁰	3 600 (ng/ml)
nach der 1. Operation:	OGTT:	0 (min)	3 040 (ng/ml)
		60 (min)	3 040 (ng/ml)
nach der 2. Operation:	OGTT:	0 (min)	1 840 (ng/ml)
		60 (min)	1 960 (ng/ml)

3. 3. 1. 2. 11 Mikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchung des Tumorgewebes

Histologie (Prof. Dr. Stochdorph, Pathologisches Institut der Universität München).

Es handelt sich um ein epitheliales Tumorgewebe mit außergewöhnlich starker Kernpolymorphie. Die Anfärbung erfolgte mit Cytoplasmaamphophil. Längs der Gefäße regelmäßige Reihen von Adenomzellen. Diagnose: Hypophysenadenom vom Mischtyp.

Ultrastruktur (Dr. Hachmeister, Pathologisches Institut der Universität Gießen).

Es zeigt sich eine erhebliche Kernpolymorphie mit zahlreichen Einbuchtungen der Kernmembran und einer klumpigen Chromatinverteilung. Die Sekretgranula sind spärlich und unregelmäßig im Cytoplasma verteilt. Es finden sich reichlich freie und gebundene Ribosomen im Cytoplasma (Abb. 27).

Wie aus der Abbildung hervorgeht, weisen Schwangerschaftszellen (Mens X) die gleiche Kernkonfiguration wie die Tumorzellen auf.

3. 3. 2. 0. 0 Normalwerte des Insulinhypoglykämietestes und der Argininbelastung

Bei 54 Normalpersonen wurde ein Insulinhypoglykämietest (2. 5.) und bei 17 Personen eine Argininbelastung (2. 8.) durchgeführt. Berechnet wurden die Mittelwerte und der Standardfehler (sem). Weiter wurde die minimale und maximale Sekretionsantwort für beide Stimulationsteste ermittelt.

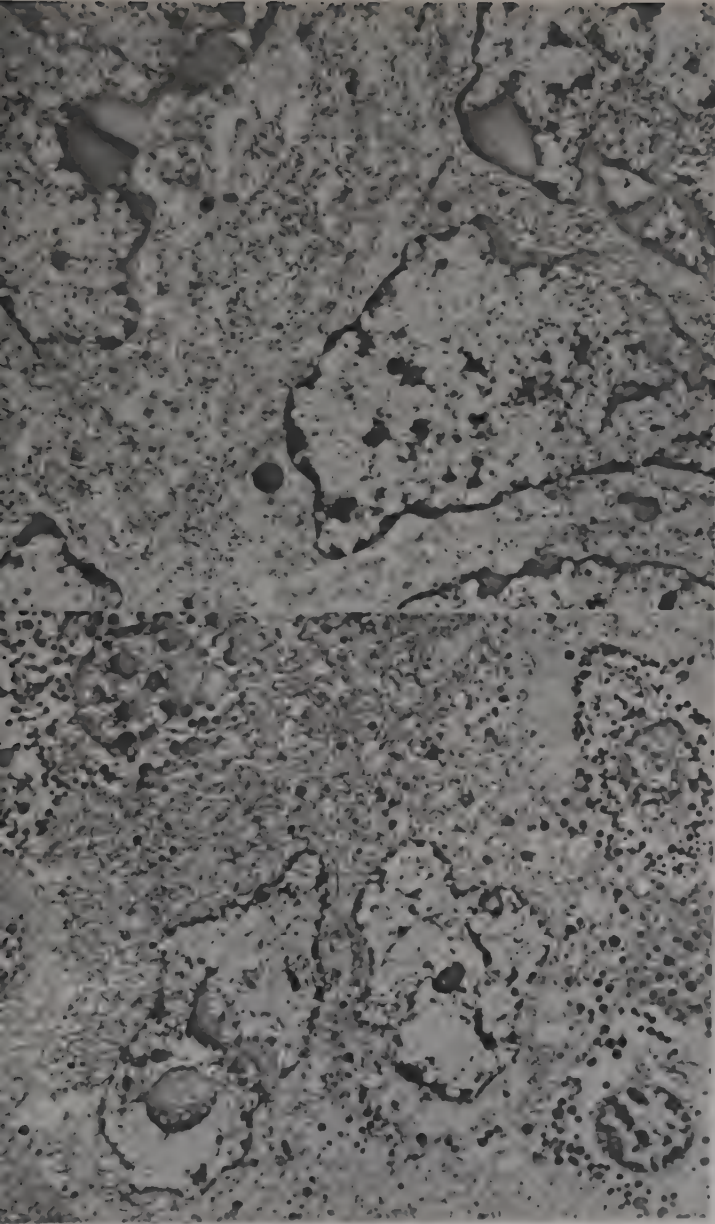


Abb. 27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von prolaktinbildenden Zellen bei Forbes-Albright-Syndrom (rechts) und am Ende einer regulären Schwangerschaft (links). Typisch finden sich bei beiden Zellkernen das randständig angeordnete Chromatin. Die Sekretgranula sind bei beiden prolaktinbildenden Zellen spärlich und unregelmäßig im Zytoplasma verteilt; dazu finden sich reichlich freie und gebundene Ribosomen. Die prolaktinbildenden Zellen der Schwangerenhypophyse sind von somatotropen Zellen umrahmt.

Tab. 23: Insulinhypoglykämietest bei Normalpersonen (Mittelwert $\pm$ sem)

Blutabnahmezeit (min)	-15	0	30	45	60	90
Glukose (mg/100 ml)	85,5 $\pm$ 1,6	85,0 $\pm$ 1,4	36,3 $\pm$ 1,4	46,3 $\pm$ 2,4	54,0 $\pm$ 2,2	62,2 $\pm$ 2,3
HGH (ng/ml)	2,3 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,5	13,4 $\pm$ 2,0	35,3 $\pm$ 3,4	39,9 $\pm$ 3,0	29,6 $\pm$ 2,8

minimaler Anstieg des Serum-HGH: 16,5 (ng/ml)
 maximaler Anstieg des Serum-HGH: 92,0 (ng/ml)

Tab. 24: Argininbelastung bei Normalpersonen (Mittelwert $\pm$ sem)

Blutabnahmezeit (min)	-15	0	30	60	90	120
Glukose (mg/100 ml)	88,0 $\pm$ 2,5	88,0 $\pm$ 2,5	104,9 $\pm$ 2,7	89,3 $\pm$ 4,3	86,6 $\pm$ 2,6	86,6 $\pm$ 2,1
HGH (ng/ml)	2,4 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 1,2	12,2 $\pm$ 2,6	20,4 $\pm$ 4,0	14,9 $\pm$ 2,3	8,2 $\pm$ 1,6

minimaler Anstieg des Serum-HGH: 4,5 (ng/ml)
 maximaler Anstieg des Serum-HGH: 69,6 (ng/ml)

4.0.0.0.0 DISKUSSION

Radioimmunologische Wachstumshormonbestimmung

YALOW und BERSON (152) haben 1960 den radioimmunologischen Test zur Bestimmung von Peptidhormonen eingeführt. Im Prinzip beruht diese Methode auf der Konkurrenz von radioaktiv markiertem und unmarkiertem Peptidhormon an den Bindungsstellen des Antikörpers. Nicht gebundenes radioaktiv markiertes Hormon ("free") und unmarkiertes Hormon in Serum oder Standardlösung sind direkt proportional. Entsprechend sind gebundenes radioaktiv markiertes Hormon ("bound") und nicht markiertes Hormon in Serum oder Standardlösung umgekehrt proportional. Antikörper gebundenes und freies Hormon trennten YALOW und BERSON (9, 152, 155) mit der Papierelektrophorese. Später wurden eine Reihe anderer Methoden zur Trennung von "bound" und "free" verwendet (16, 22, 23, 63, 73, 110, 111, 149a, 151). Wir haben vier verschiedene Trennungsmethoden verglichen.

Salzfällungsmethode

GRODSKY und FORSHAM (55a) beschrieben 1960 die Ausfällung des gebundenen Hormons mit gesättigter Natriumsulfatlösung. Diese einfache Methode ist allerdings ungenau, wenig empfindlich und stark abhängig von der Kopräzipitation der Serumproteine (siehe 2.1.4.1.4), die bekanntlich radioaktives HGH binden (100, 142) und somit zu falsch niedrig gemessene HGH-Serumspiegel führen. Wir fanden, daß es für die Verwendbarkeit dieses Testes ganz wichtig ist, die optimale Salzkonzentration und Fällungszeit zu ermitteln (Abb. 3). Außerdem mußten wir die Proteinkonzentrationen der Serumproben und der Eichwerte durch Zugabe von Rin-

der serum angleichen. Trotzdem hatten wir teilweise eine unspezifische Kopräzipitation bis zu 40 % der Gesamtaktivität. Die Spezifität des Testes ist bei allen Methoden nur von der Güte des verwendeten Antikörpers abhängig (siehe 2. 1. 4. 2. 5).

Charcoal-Methode

Größere Sensitivität und Präzision läßt sich mit der Coated-Charcoal-Absorptionsmethode nach HERBERT et al. (63) erreichen (siehe 2. 1. 4. 2. 7). Ungebundenes HGH wird von der beschichteten Holzkohle absorbiert. Diesen Effekt der Trennung von "bound" und "free" bezeichnen HERBERT et al. (63) als "instant dialysis", während KEANE et al. (73) einen Molekularsieb-Effekt für wahrscheinlich halten. Die Verbesserung der Absorption durch die Dextranbeschichtung erklären PALMIERI et al. (112) durch eine Vergrößerung der aktiven Oberfläche. Serumproteine beeinflussen die Adsorption beträchtlich (108, 133). RODBARD et al. (124a) fordern, nur Systeme zu verwenden, die weniger als 5 % unspezifische Bindung aufweisen. Solche Werte konnten wir nur im serumfreien Medium erreichen. NADEAU und ZAHND (108) haben eine mathematische Korrektur der Proteineinflüsse versucht. Wichtig erscheint uns zu sein, daß die Proteinverhältnisse aller Proben angeglichen werden. Das Adsorbens soll immer die gleiche Temperatur haben. (Wir haben eiswassergekühlte Lösungen verwendet - siehe 2. 1. 4. 2. 3.) Die Konzentration des Adsorbens hielten wir durch konstante Rühr- und Entnahmetechnik annähernd gleich. Die Adsorption ändert sich zwischen einer Minute und Stunden nicht. Eine mögliche Erklärung für unsere mäßigen Ergebnisse könnte das verwendete Dextran T 70 sein, denn WOOL und SELENKOV (151) haben mit Dextran 150 sehr gute Ergebnisse erreicht. PALMIERI et al. (112) glauben allerdings, daß das schnelle und einfache Verfahren für HGH nicht besonders geeignet ist.

Solid Phase-Methode

Den geringsten Arbeitsaufwand erfordert die Solid Phase-Methode nach CATT et al. (21, 22, 23). Sie beruht auf den Befunden von LEININGER et al. (94), daß Kunststoffe an ihrer Oberfläche Eiweißkörper binden. So werden bei dem Test Kunststoff-Röhrchen verwendet, an deren Wänden Antikörper in einer monomolekularen Schicht adsorbiert sind. Die Trennung von "bound" und "free" erfolgt dann durch Aspiration des Röhrcheninhalts nach der Inkubation. Diese Methode scheint wegen ihrer Einfachheit für Routine-Untersuchungen besonders geeignet. Mit Verlängerung der Gesamtinkubationszeit konnten wir die Sensitivität stark verbessern (siehe 2.1.4.3.2), was durch eine Vorinkubation noch zusätzlich zu verbessern wäre. Die verwendete Eichkurve überstreicht einen großen Bereich von Standardkonzentrationen (Abb. 7), so daß man niedrige und hohe Serum-Hormon-Konzentrationen auf einer Eichkurve ablesen kann. Sensitivität und Präzision sind zwar geringer als bei der später beschriebenen Doppelantikörpermethode (siehe 2.1.4.3.3), jedoch wesentlich besser als bei den vorhergehenden Verfahren (Abb. 13).

Doppelantikörpermethode

Das Prinzip der Fällung von löslichen Antikörpern mit einem zweiten Antikörper nach SKOM und TALMAGE (135) haben HALES und RANDLE (60), MORGAN und LAZAROW (105) und UTIGER et al. (144) auf den radioimmunologischen Test angewandt. In unserem Labor verwendeten wir ein halbautomatisches Bestimmungsverfahren nach BOTTERMANN et al. (12). Diese Methode ist empfindlich und genau. Durch verlängerte Vorinkubation von Antikörper und Standard bzw. Serum (60, 73, 124) konnten wir die Sensitivität weiter steigern (Abb. 12). Das Präzipitat kann vom Überstand durch Zentrifugation oder Filtration erfolgen. Bei der Filtrationsmethode

geht der "damage"-Anteil des Tracers nicht in die Bestimmung ein (104). Die Bindung des freien Hormons an das Filter ist minimal (1 %). Wie auch WESTPHAL (149a) zeigen konnte, ist Serum-HGH stabil gegen Erhitzen (56°), Tiefkühlen (-20°) sowie öfteres Auftauen und Einfrieren. Ein großes Problem stellt allerdings die HGH-Bestimmung in hämolytischen Seren dar. Wir konnten zeigen, daß bei mäßiger Hämolyse die HGH-Serumwerte bis zu 30 % zu hoch bestimmt werden (Abb. 8). WESTPHAL (149a) fand bei zunehmender Hämolyse falsch niedrige Werte. Der scheinbare Widerspruch erklärt sich durch die verschiedenen Trennungsmethoden. Möglicherweise bindet Hämoglobin radioaktiv markiertes HGH und vergrößert somit den "bound"-Anteil. Das ergibt bei der "paper flow"-Methode falsch niedrige Serumwerte. Andererseits wird das Hämoglobin durch den 2. Antikörper nicht präzipitiert und erhöht somit den freien Anteil des radioaktiv markierten Hormons. Außerdem wird dem Massenwirkungsgesetz entsprechend weniger radioaktives HGH an den 1. Antikörper gebunden. Durch diese beiden Faktoren vermindert sich das radioaktive Präzipitat, und das erklärt die falsch hohen Werte in der Doppelantikörpermethode. Einen unspezifischen Hemmfaktor im Serum haben bereits UTIGER et al. (144) 1960 im ersten HGH-Doppelantikörper-Test beschrieben. HALES und RANDLE (60), SAMOLS und BILKUS (128), BRUNFELDT und JORGENSEN (16) fanden eine Kreuzreaktion des humanen γ -Globulins mit dem präzipitierenden Antikörper. MORGAN und LAZAROW (106, 107) erklären die Verminderung des Präzipitats bei Serumzusatz durch die Hemmwirkung der hitzelabilen Komplementfraktion. Diese Hemmung kann durch den Chelatbildner EDTA aufgehoben werden. Außerdem beschleunigt EDTA die Präzipitationsreaktion (49) und hat keinen Einfluß auf die HGH-Antikörper-Reaktion (77, 106, 145). In unserem System haben die hitzelabilen Komplementfraktionen keinen Einfluß, ebenso wenig die Verdünnung des Serums an sich (Abb. 9, 10). Der Proteingehalt der Standardproben und der Serumproben ist angeglichen (2. 1. 4. 4. 1).

Paper Flow

Der von uns verwendete Tracer war nach der Methode von GREENWOOD et al. (53) mit ^{131}J bzw. ^{125}J markiert worden. Heute verwendet man hauptsächlich ^{125}J zur Proteinmarkierung (40, 132). Seine längere Halbwertszeit, der hohe Isotopengehalt der Präparationen und die relativ bessere Zählausbeute heben den Vorteil der höheren spezifischen Aktivität des ^{131}J auf (40, 101, 111). Unser HGH- ^{125}J war mit der Methode der anodischen Oxidation nach U. ROSA (124a) gewonnen worden. Dabei wird eine hohe Ausbeute bei geringer chemischer Degradation erreicht. Mit der Pufferchromatographie (149a, 155) versuchten wir den Anteil der Degradationsprodukte zu erfassen, da diese aggregieren und sich unspezifisch an Serumproteine binden (58, 100, 111) (Abb. 2). Wir wollten damit ein Maß für die Güte der Markierung erhalten (siehe 2. 1. 3. 4). Wir konnten aber weder für HGH- ^{125}J noch für LH- ^{131}J eine Korrelation zwischen dem chromatographischen "damage" und dem immunologischen Bindungsvermögen oder der spezifischen Aktivität herstellen. Auch zwischen spezifischer Aktivität und immunologischer Bindung bestand keine Korrelation. Allerdings fanden auch GREENWOOD et al. (53) erst bei sehr hohen spezifischen Aktivitäten eine Veränderung der Immunoreaktivität.

Immunoreaktivität von exogenem HGH

Es ist anzunehmen, daß der Tracer immunologisch und biologisch anders reagiert als die Standardpräparation oder das Plasmaproteohormon (33, 57, 68, 154). Nach HADDEN und PROUT (57) verhalten sich niedrig markierte Proteohormone dem Standardhormon ähnlicher als hochmarkierte. Allein entscheidend ist allerdings die Identität der Immunoreaktivität von Wachstumshormonstandardpräparationen aus der Hypophyse und Wachstumshormon des

Serums (24, 142, 154). Über die Heterogenität der HGH-Präparationen aus Hypophysen liegen zahlreiche Arbeiten vor (4, 13, 36, 64, 66, 67, 82, 123, 142). Das Verhalten der HGH-Antikörper hängt direkt von der zur Immunisierung verwendeten Präparation ab (64, 66). Unsere Antikörper zeigten gegenüber drei Wilhelmi- und einer Roos-HGH-Präparation identisches Verhalten (Abb. 14). Die HGH-Präparation nach WILHELMI (150a) erfolgt durch alkalische Extraktion. Das Roos-HGH ist eine durch Gelfiltration gewonnene Präparation (124c). Dieses Verhalten bezeichneten LANDON et al. (80) als Immunoidentität. In Untersuchungen am ACTH-Molekül unterschieden sie:

- (1) Immunoidentität, d.h. äquimolare Lösungen von Standard- und Plasmahormon ergeben dieselbe Verdrängung des Tracerhormons aus der Antikörperbindung.
- (2) Ähnliche Immunoreaktivität, d.h. Verdünnungskurve und Standardkurve verlaufen parallel.
- (3) Andersartige Immunoreaktivität, d.h. Verdünnungs- und Eichkurve verlaufen nicht parallel.

Eine Differenzierung zwischen gleicher und ähnlicher Immunoreaktivität war uns nicht möglich, da uns die Molarität der HGH-Lösung nicht sicher bekannt war. Die Wilhelmi-Präparation der Abbott Laboratories allerdings hatte demnach nur eine ähnliche Immunoreaktivität, da die Meßwerte zwar gering, aber konstant unter den von der Firma angegebenen HGH-Konzentrationen lagen (siehe 3.1.1.2). Eine Immunoidentität zwischen Standard- und Serum-HGH ist für die Richtigkeit des radioimmunologischen Testes unabdingbar (101). Die jeweiligen Meßwerte dürfen nicht vom Grad der Verdünnung abhängig sein.

HGH- und HCS-Bestimmung in der Schwangerschaft

Alle von uns auf ihre HGH-Immunoreaktivität hin untersuchten Sera von Schwangeren wiesen eine gleichartige und annähernd gleich große Abweichung vom Slope der Standardkurve auf (Abb. 19). Mit fortschreitender Verdünnung ergab sich eine unverhältnismäßig geringe Erhöhung des radioaktiven Präzipitats. GREENWOOD et al. (53) und GLICK et al. (121) entdeckten, daß beginnend mit der 8. Schwangerschaftswoche eine fortschreitende Abweichung von der Standardkurve bis zu 65 % in der 23. Woche erfolgt. Unsere Untersuchungen in der 36.-39. Schwangerschaftswoche zeigten Abweichungen bis zu 70 %. Dieselbe Abweichung erreichten GREENWOOD et al. (53) mit einem gereinigten Placentaextrakt, der von JOSIMOVICH und McLAREN (47) als neues Hormon HPL = Human Placental Lactogen identifiziert wurde. Es wird heute nach LI et al. (170) als HCS = Human Chorionic Somatomammotropin bezeichnet. HCS ist in der Primärstruktur zu 90 % homolog zu HGH (46). Daraus erklärt sich die Kreuzreaktivität des HCS mit den HGH-Antikörpern (45) (siehe 2. 1. 4. 2. 5 und 3. 1. 2. 1). Die von uns gemessene HCS-Konzentration betrug $12,3 \pm 2,4 \mu\text{g/ml}$ ($\pm \text{sem}$) (Tab. 8). Nach Angaben anderer Autoren (49, 50) scheint dieser Wert zu hoch zu sein. Unser Kollektiv war allerdings nicht selektioniert, so daß auch Patienten mit Mehrlingsschwangerschaften dabei sein konnten. Ein Präzisionsserum bestätigte die Richtigkeit unserer Messungen. Der durchschnittliche HGH-Serumspiegel von $8,6 \pm 2,5 \text{ g/ml}$ ($\pm s$) (bestimmt in einer Serumverdünnung 1 : 6) lag weit über dem Nüchternspiegel unserer Normalpatienten (Kapitel 3. 3. 2). Dasselbe haben HUNTER und GREENWOOD bereits 1962 festgestellt (150). Korrigiert man allerdings anhand von Nomoogrammen die Kreuzreaktion des HCS, so ergeben sich auch in der Schwangerschaft normale HGH-Spiegel (152, 155). Entsprechend dem endogenen HCS zeigte auch die HCS-Standard-Präparation (S. O. R. I. N.) eine beträchtliche Kreuzreaktion mit dem HGH-Anti-

körper (Abb. 5, 15). 200 ng HCS verdrängten 1 ng HGH aus der Bindung mit dem HGH-Antikörper. Mit steigender HCS-Konzentration erhöht sich allerdings dieses Verhältnis, was mit den Angaben anderer Autoren vergleichbar ist (55, 56).

Kreuzreaktion mit dem HGH- und HCS-Antikörper

Eine deutliche Kreuzreaktion des HGH-Antikörpers mit TSH (NIH) im Verhältnis 100 : 1 erklärt sich allein aus der Kontamination der TSH-Präparation mit HGH und ist somit keine echte Kreuzreaktion. Das Glykoprotein TSH ist dem HGH in der Struktur unähnlich. Humanes LH und Rinderprolaktin zeigten keine Kreuzreaktion. Eine strukturelle Verwandtschaft zwischen humanem Prolaktin und HGH und HCS ist anzunehmen (11, 42, 88, 90). Trotzdem zeigte ein Serum, das 3200 ng/ml humanes Prolaktin enthielt, keine Kreuzreaktion (Abb. 16); denn die Serumverdünnungskurve verlief parallel zur Eichkurve.

Wie beim HGH-Antikörper zeigen HGH und HCS auch ein kompetitives Verhalten hinsichtlich ihrer Bindung an den HCS-Antikörper. So verdrängen 200 ng HGH etwa 10 ng HCS aus der Bindung mit dem HCS-Antikörper (Abb. 17). Diese Kreuzreaktion hat jedoch keinen Einfluß auf die HCS-Bestimmung in der Schwangerschaft, da die HCS-Spiegel im μg -Bereich liegen und außerdem nur in der Akromegalie derart hohe HGH-Serumspiegel bestehen. Eine nicht schwangere akromegale Patientin (HGH-Spiegel: 193 ng/ml) wies einen scheinbaren HCS-Spiegel von 7 ng/ml auf. Menschliches LH und TSH zeigten keine Kreuzreaktion (Abb. 17). Die Verdünnungskurven der Schwangerenserum ließen sich mit der HCS-Eichkurve zur Deckung bringen (Abb. 18). Es lag also eine identische Immunreaktivität vor. Die HCS-Bestimmung erfolgte bei Serumverdünnungen 1 : 200 - 1 : 400, so daß die HGH-Kreuzreaktion mit dem HCS-Antikörper nicht deutlich wurde.

Immunoreaktivität von endogenem HGH

Über die Immunoreaktivität des HGH bei nicht schwangeren Patienten mit normaler HVL-Funktion berichtete WESTPHAL (149a). Allerdings hat er keine Angaben über die Veränderung der Immunoreaktivität im Verlauf eines IHT gemacht. Wir untersuchten die Immunoreaktivität von HGH bei Patienten mit besonders ausgeprägtem HGH-Anstieg. Die Verdünnungskurven von sieben 30-Minutenwerten, fünf 45-Minutenwerten und fünf 60-Minutenwerten von Insulinhypoglykämietesten von Patienten mit normaler HVL-Funktion ergaben im linearen System (154) und nach Logittransformation (124a) bis auf eine Ausnahme (30-Minutenwert) eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Slope der Standardkurve, während acht 90-Minutenwerte eine abweichende Immunoreaktivität zeigen (Tab. 13, Abb. 22). Unspezifische Serumfaktoren (154) bieten keine Erklärung dafür, weil unwahrscheinlich ist, daß sich pH-Wert, Ionenstärke, Ionenmilien, Komplementfaktoren und Serumproteine während des IHT ändern. Außerdem wurde kein Heparin bei der Blutabnahme verwendet und der B/B_0 -Wert des "damage" betrug konstant 1 - 2 % (154). LANDON et al. (80) haben analoge Abweichungen vom Slope der Standardkurve für ACTH-Metaboliten beschrieben. Es wäre also denkbar, daß Stoffwechselprodukte des HGH für die unverhältnismäßig stark abfallende Immunoreaktivität des HGH beim Verdünnen verantwortlich sind. BALA et al. (2, 3), STUART et al. (139), IRIE und BARETT (67) weisen im Serum Metabolite des HGH nach, die immunologisch und biologisch wie HGH reagieren. STUART et al. (139) finden eine Zunahme dieser Molekülfraction im Verlaufe des IHT und 60 Minuten nach einer HGH-Infusion. LARON et al. (86) konnten zeigen, daß zu 70 % enzymatisch abgebautes HGH noch immunologisch aktiv ist. Damit könnten die HGH-Metaboliten für die geänderte Immunoreaktivität verantwortlich sein. Dagegen spricht allerdings, daß wir bei den 11 Nüchternseren von akromegalen Patienten keine Veränderung der Immunoreaktivität feststellen konnten (Abb. 20). Die biologische Halb-

wertszeit und metabolische Clearance-Rate sind bei diesen Patienten gegenüber den Gesunden unverändert (18, 47, 99, 141). Direkt aus dem Bulbus cranialis venae jugularis internae entnommenes Blut wies keine Veränderung der HGH-Immunoreaktivität auf, obwohl die Serum-HGH-Spiegel bis zu doppelt so hoch waren (Abb. 21). BALA et al. (2) und STUART et al. (139) fanden, daß bei akromegalen Patienten mehr als 50 % des Serum-HGH in höher molekularer Form vorliegen als das HGH-Monomer (93). Dieses höhermolekulare HGH könnte einen HGH-Trägerproteinkomplex darstellen (26, 58, 59). Die Absättigung dieses Trägerproteins in der Akromegalie würde erklären, daß hier die Fraktion des HGH mit Molekulargewicht um 21500 besonders groß ist (2). Eine andere Möglichkeit wäre, daß HGH-Metabolit unspezifisch an Serumproteine gebunden werden (100, 70, 10, 3). CHEEVER und LEWIS (25), SQUIRE und PEDERSEN (136), HANSON et al. (61) berichten von Aggregationen von HGH. Ein HGH-spezifisches Trägerprotein wird heute abgelehnt (10, 100). Die Aggregationen sind konzentrationsabhängig und müßten folglich gerade bei der Akromegalie auftreten. Durch die fortschreitende Verdünnung müßte aus den Aggregaten und Serumproteinbindungen immer mehr immunologisch aktives HGH freigesetzt werden und immer mehr radioaktives HGH aus der Antikörperbindung verdrängen. Wir haben aber genau das Gegenteil beobachtet. Da auch nach Infusion von 2 mg exogenem HGH über einen Zeitraum von 2 Stunden keine Veränderung der HGH-Immunoreaktivität beobachtet wurde (147a), läßt sich dieser Befund am ehesten mit der Sekretion einer HGH-Vorstufe ("big"-HGH) oder HGH-Speicherform analog zum Proinsulin (138) und zum "big"-Gastrin erklären (153). Bei der Akromegalie ist die HGH-Ausschüttung dauernd vermehrt und der Hypophysenstoffwechsel dieser Mehrsekretion angepaßt. Die normale Hypophyse sezerniert aber auf einen starken hypoglykämischen Reiz auch Vorstufen oder Speicherformen des HGH. Das ist kein Widerspruch zur Tatsache, daß die Hypophyse die 10-fache HGH-Tagesproduktion ge-

speichert hat (79), wie das analoge Verhalten der β -Zelle des Pankreas hinsichtlich der Insulinsekretion zeigt (8).

Biologische Halbwertszeit des HGH

Unsere vergleichenden Bestimmungen im Blut des Bulbus cranialis venae jugularis internae (= zentral) und in einer Vena cubitalis (= peripher) haben gezeigt, daß bei Akromegalen kein Unterschied bezüglich der Immunoreaktivität bestand, obwohl die zentral gemessenen HGH-Spiegel bis zu 80 % höher lagen als peripher (Abb. 21). Ausgangs wollten wir mit dieser Methode die Frage untersuchen, warum die HGH-Sekretion übergewichtiger Patienten weniger stimulierbar ist (5, 7, 27, 126). Das durchschnittliche Übergewicht unserer Patienten betrug 85 % bei einem Durchschnittsalter von 24,4 Jahren. Der Grund für die erniedrigte Reizantwort könnte eine verminderte HGH-Sekretion der Hypophyse sein, oder eine vermehrte Bindung von HGH an seinem Wirkungsort in der Peripherie, z. B. durch die große Oberfläche der Fettzellen. Falls letzteres zutrifft, sollte eine größere Differenz als bei Normalgewichtigen zwischen zentral und peripher gemessenen HGH-Spiegeln gefunden werden. Wir konnten aber weder bei fünf adipösen noch bei zwei normalgewichtigen Patienten mit normaler HVL-Funktion eine solche Differenz finden (Abb. 24). Auch für TSH und LH konnten wir keine zentral-periphere Differenz feststellen. Zur Kritik dieser Methode muß gesagt werden, daß das HVL-Blut bereits mit 15 % des Herzzeitvolumens verdünnt ist (134) und außerdem nicht das ganze Hypophysenblut über den Bulbus cranialis abfließt (134). Überraschenderweise ergab sich dann bei akromegalen Patienten eine beträchtliche Differenz. NICOLL et al. (109) fanden bei Rhesusaffen einen Faktor von 1 bis 130 zwischen GH-Spiegel im Sinus cavernosus und in der Peripherie. GANONG und HUME (44) fanden bei Schafen für ACTH einen Faktor 90. Eine Erklärung für dieses Verhalten bietet

die mögliche Sekretionsweise der Hypophyse. Nach CRYER und DAUGHADAY (28) und NICOLL (109) et al. wird HGH stoßweise von der Hypophyse sezerniert, weil die gemessenen HGH-Serum-Peaks in der Peripherie schmalbasiger sind als die durch die biologische Halbwertszeit zu erwarten wäre. Die biologische Halbwertszeit scheint aber auch bei der Akromegalie nicht verändert zu sein (47, 99). Die Verteilungszeit des HGH beträgt nur wenige Minuten (47, 115, 129). Damit ist es wahrscheinlich, daß wir bei einer Blutabnahme in 15 Minuten bis auf eine Ausnahme (Tab. 16) immer die spikeartige Sekretion versäumt haben. Außerdem nahm die Blutabnahme selbst 1 - 2 Minuten in Anspruch. Selbst bei einer Abnahme alle fünf Minuten konnten wir keine Differenz feststellen. Bei der Akromegalie, bei der wir eine deutliche Differenz der zentral-peripheren HGH-Spiegel fanden, scheint eher eine kontinuierliche HGH-Sekretion vorzuliegen. Möglicherweise ist das mit ein Unterschied zur normalen Hypophysenfunktion.

Die beschriebenen "Spikes" bedingen eine große Schwankungsbreite der zentral-peripheren Differenz des HGH-Spiegels (109). Damit wird das Prinzip der von uns durchgeführten Berechnung der biologischen Halbwertszeit äußerst fragwürdig. Legt man die Angaben von NICOLL et al. (109) zu Grunde, würden die berechneten Halbwertszeiten mit einem Faktor 100 schwanken. Weiter ist der Plasmafluß durch das Schädelinnere nur korrekt, wenn alles Blut durch den Bulbus cranialis abfließt. Weiter ist es fraglich, ob das von PARKER et al. (115) mit HGH-¹³¹J bestimmte Verteilungsvolumen auch für endogenes HGH gilt. Aus diesen Gründen ist eine Bestimmung der biologischen Halbwertszeit mit dieser Methode abzulehnen. Daß wir aber trotzdem einander vergleichbare biologische Halbwertszeiten (115) berechnen konnten, liegt an der wahrscheinlich kontinuierlichen HGH-Sekretion bei akromegalen Patienten.

Forbes-Albright-Syndrom

Bereits 1961 wurde durch LYONS et al. (96) entdeckt, daß menschliches Wachstumshormon die Milchsekretion stimuliert. LI et al. (87), IRIE und BARNETT (67), TASHIJAN et al. (140), BEWLEY et al. (11) und DAMM et al. (29) glaubten, daß HGH für den Menschen zugleich das Laktationshormon sei. Dagegen fanden RIMOIN et al. (122), daß Minderwüchsige mit isoliertem HGH-Mangel eine normale Laktation aufwiesen. FORBES et al. (38) beschrieben 1954 ein Syndrom mit Galaktorrhoe ohne Zeichen einer HGH-Hypersekretion. Auch wir konnten zeigen, daß die Laktation unabhängig vom HGH-Serumspiegel ist (Tab. 19, 20). Außerdem zeigte weder bovines noch humanes Prolaktin mit unserem HGH-Antikörper eine Kreuzreaktion (Abb. 15, 16). Es zeigt sich somit, daß Prolaktin auch immunologisch von HGH verschieden ist. Allerdings hat auch HGH eine laktogene Wirkung (39, 140). Heute steht fest, daß Prolaktin auch beim Menschen ein eigenständiges Hypophysenhormon ist (39, 76, 116, 143). An einer Patientin mit Forbes-Albright-Syndrom (1, 20, 38, 120) konnten wir demonstrieren, daß Prolaktin von azidophilen, speziell mit Erythrosin färbbaren Zellen in 500 μ m großen, diffus verteilten Granula gespeichert wird und unabhängig von HGH sezerniert wird (39, 116) (Abb. 27). Die Tumorzellen in unserem Operationspräparat waren den Schwangerschaftszellen der Hypophyse gleich, was auch PEAKE et al. (116) festgestellt haben. Wie aus Abb. 25, Abb. 26 und Tab. 18 hervorgeht, führte der Prolaktin-sezernierende Hypophysentumor zu einer Verminderung der LH-Basalsekretion und der hypophysären HGH-Reserve, während die ACTH- und TSH-Sekretion normal stimulierbar war (siehe 3. 3. 1. 2. 4 und 3. 3. 1. 2. 6). Dieser Befund wurde durch die zwei Operationen nicht beeinflusst. Dies bestätigt erneut, daß die TSH- und ACTH-Sekretion bei Schädigung der Hypophyse (Tumor) weniger beeinflusst wird. In erster Linie führt das Tumorwachstum zu einer Störung der Sekretion von Gonadotropinen und Wachstumshormon (79, 110, 150).

5.0.0.0.0 ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Wir haben vier verschiedene radioimmunologische Methoden zur HGH-Bestimmung im Serum bezüglich Sensitivität, Präzision und Spezifität verglichen. Dabei war die Doppelantikörpermethode sowohl der Salzfällungsmethode als auch der Trennung von "bound" und "free" mit Dextran-beschichteter Holzkohle überlegen. Die Solid-Phase-Methode war einfacher zu handhaben und hatte einen größeren Meßbereich, jedoch mit geringerer Präzision. Durch Veränderung der Inkubationsbedingungen konnten wir die Sensitivität entscheidend verbessern. Weiter untersuchten wir den Einfluß von Serumproteinen, Komplementfraktionen, Hämolyse und Serumverdünnung vor allem auf die Doppelantikörpermethode.
- 2) Außerdem haben wir zwei verschiedene HGH-Antikörperpräparationen auf ihre Kreuzreaktion mit LH, TSH, HCS, BPr und HPr hin überprüft. Die TSH-Präparation war mit HGH kontaminiert. Nur HCS zeigte mit den HGH-Antikörpern eine Kreuzreaktion. Daher mußten die in der Schwangerschaft gemessenen HGH-Serumspiegel korrigiert werden. Umgekehrt hat HGH mit unserem HCS-Antikörper kreuzreagiert, während LH und TSH keine Kreuzreaktivität aufwiesen.
- 3) Für die Validität eines radioimmunologischen Systems ist es erforderlich, daß die Serumverdünnung ohne Einfluß auf den Test ist. Sowohl für unser HGH- als auch HCS-Doppelantikörpersystem war diese Bedingung erfüllt. Ausgenommen davon war nur der 90-Minutenwert des Insulinhypoglykämietestes bei Personen mit normaler HVL-Funktion. Diesen auffallenden Befund erklärten wir durch die Sekretion einer immunodifferenten HGH-Vorstufe oder HGH-Speicherform nach maximaler Stimulation der HGH-Ausschüttung.

4) Bei Normalpersonen konnten wir keine Differenz der Serum-HGH-Spiegel im Bulbus cranialis der vena jugularis und einer Kubitalvene finden, während zwei Patienten mit Akromegalie deutliche Unterschiede zeigten. Wir erklärten das mit der spike-artigen HGH-Sekretion bei der Normalperson und der kontinuierlichen HGH-Sekretion bei der Akromegalie. Außerdem haben wir mit dieser Methode die biologische Halbwertszeit des endogenen HGH bei Akromegalen bestimmt.

5) Bei einer Patientin mit Forbes-Albright-Syndrom mit einem prolaktinsezernierenden Hypophysentumor war die Sekretion von LH und HGH vermindert, die ACTH- und TSH-Sekretion aber nicht beeinträchtigt. Wir konnten bestätigen, daß Prolaktin auch beim Menschen ein vom HGH verschiedenes Hormon der Hypophyse sein muß. Die Tumorzellen des Operationspräparates dieser Patientin glichen normalen Schwangerschaftszellen der Hypophyse.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. P.C. Scriba für die freundliche Überlassung des Themas.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. med. Klaus von Werder für seine unermüdliche Hilfe und Kritik.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. A. Souvatzoglou schulde ich Dank für viele Anregungen.

Für die Unterstützung bei zahlreichen Versuchen danke ich Fräulein R. Ermler und Fräulein U. Henderkott, für die sorgfältige Ausführung von graphischen Darstellungen Herrn L. Bestler und für die photographischen Abbildungen Fräulein F. Haag.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Argonz, J. and E. B. del Castillo: A syndrome characterized by estrogenic insufficiency, galactorrhea and decreased urinary gonadotropin. *J. Clin. Endocr.* 13:953, 1953
- 2) Bala, R. M., K. A. Ferguson and J. L. Beck: Growth hormone like activity in plasma and urine. In: *Growth and Growth Hormone* (eds.: Pecile, A., E. E. Müller) *Excerpta med. (Amst.)* ICS 244:483, 1972
- 3) Bala, R. M., K. A. Ferguson and J. C. Beck: Plasma biological and immunoreactive growth hormone - like activity. *Endocrinology* 87:506, 1971
- 4) Barrett, R. J., H. Friesen and E. B. Astwood: Characterization of pituitary and peptide hormones by electrophoresis in starch gel. *J. Biol. Chem.* 237:432, 1962
- 5) Beck, P., J. H. T. Koumans, C. A. Winterling, M. F. Stein, W. H. Daughaday and D. M. Kipnis: Studies of insulin and growth hormone secretion in human obesity. *J. Lab. Clin. Med.* 64:654, 1964
- 6) Beck, P. and W. H. Daughaday: Human placental lactogen: Studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man. *J. Clin. Invest.* 46:103, 1967
- 7) Bell, J. P., R. A. Donald and E. A. Espiner: Pituitary response to insulin-induced hypoglycemia in obese subjects before and after fasting. *J. Clin. Endocr.* 31:546, 1970
- 8) Bennett, L. L., G. M. Grosky: Multiphasic aspects of insulin release after glucose and glucagon. In: *Diabetes* (eds.: Östman, J., R. D. G. Miller), *Excerpta med. (Amst.)* 1969, p. 461

- 9) Berson, S.A. and R.S. Yalow: Immunoassay of protein hormones. In: The Hormones, Vol IV (eds.: Pincus, G., K. V. Thimann, E. B. Astwood) Academic Press, New York-London, 1964, p.557
- 10) Berson, S.A. and R.S. Yalow: State of human growth hormone in plasma and changes in stored solutions of pituitary growth hormone. J. Biol. Chem. 241:5745, 1966
- 11) Bewley, T.A. and C.H. Li: Primary structures of human pituitary growth hormone and sheep pituitary lactogenic hormone compared. Science 168:1361, 1970
- 12) Bottermann, P., R. Ermler, J. Henner: A semiautomatic method for immunoassay of insulin and human growth hormone. Metabolic Res. 3:55, 1971
- 13) Boucher, B.J.: Immuno-electrophoresis of human sera with antisera to Raben growth hormone. Nature 188:1025, 1960
- 14) Boucher, B.J., W.J.H. Butterfield, M.J. Whichelow: The disappearance of labelled HGH from the forearm circulation in normal and diabetic subjects. Clin. Sci. 37:721, 1969
- 15) Brauman, J., H. Brauman, J. L. Pasteels: Immunoassay of growth hormone in cultures of human hypophysis by the method of complement fixation: Comparison of the growth hormone secretion and the prolactin activity. Nature 202:1116, 1964
- 15a) Brazeau, P., W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, R. Guillemin: Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. Science 179:77, 1973
- 16) Brunfeldt, K. and K. R. Jorgensen: Some factors of significance in the double antibody immunoassay of Insulin. Acta Endocr. 54:347, 1967

- 17) Burr, J. M. , D.B. Grant, P.C. Sizonenko, S. L. Kaplan and M. M. Grumbach: Some critical factors in double antibody radioimmunoassay systems utilizing sheep anti rabbit precipitating sera for measurement of human serum LH, FSH and HGH. *J. Clin. Endocr.* 29:948, 1969
- 18) Cameron, D.P. , H.G. Burger, K.J. Catt and A. Doig: Metabolic clearance rate of radioiodinated human growth hormone in man. *J. Clin. Invest.* 48:1600, 1969
- 19) Conklin, J. L. : *Anat. Rec.* 156:347, 1966
- 20) Canfield, M. C. J. , R. W. Bates: Nonpuerperal galactorrhea. *New Eng. J. Med.* 273:17, 1965
- 21) Catt, K. J. : Radioimmunoassay with antibody coated discs and tubes. *Acta Endocr. Suppl.* 142:222, 1969
- 22) Catt, K. , H. D. Niall and C. W. Tregear: A solid phase disc radioimmunoassay for human growth hormone. *J. Lab. Clin. Med.* 70:820, 1967
- 23) Catt, K. and G. W. Tregear: Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. *Science* 158:1570, 1967
- 24) Cerasi, E. , L. Della Casa, R. Luft and A. Roovete: Determination of human growth hormone (HGH) in plasma by a double antibody radioimmunoassay. *Acta Endocr.* 53:101, 1966
- 25) Cheever, E. V. and U. J. Lewis: Estimation of the molecular weights of the multiple components of growth hormone and prolactin. *Endocrinology* 85:456, 1969
- 26) Collipp, P. J. , S. A. Kaplan, D. C. Boyle and C. S. N. Shimizu: Protein bound human growth hormone. *Metabolism* 13:532, 1964

- 27) Copinschi, G., L. C. Wegienca, S. Hane and P.H. Forsham: Effect of arginine on serum levels of insulin and growth hormone in obese subjects. *Metabolism* 16:485, 1967
- 28) Creyer, P.E. and W.H. Daughaday: Regulation of growth hormone secretion in acromegaly. *J. Clin. Endocr.* 29:386, 1969
- 29) Damm, H.C., J.M. Dominguez, J. Pensky and O.H. Pearson: Quantitative observations on the biological and immunological assays of human growth hormone. *Endocrinology* 74:366, 1964
- 30) Dominguez, J.M. and O.H. Pearson: Immunologic measurement of growth hormone in human sera. *J. Clin. Endocr.* 22: 865, 1962
- 31) Donald, R.A.: Application of the coated charcoal separation method to the radioimmunoassay of plasma corticotrophin. *J. Endocr.* 41:499, 1968
- 32) Earll, J.M., L.L. Sparks, P.H. Forsham: Glucose suppression of serum growth hormone in the diagnosis of acromegaly. *J. Amer. med. Ass.* 201:628, 1967
- 33) Ekins, R.P., G.B. Newman, J.L.H. O'Riordan: Theoretical aspects of saturation and radioimmunoassay. In: "Radioisotopes in medicine: in vitro studies." (eds.: R.L. Hayes, F.A. Goswitz, B.E.P. Murphy) US. Atomic Energy Commission 1968, p. 57
- 34) Evans, H.M. and M.E. Simpson: Hormones of the anterior hypophysis. *Amer. J. Physiol.* 98:511, 1931
- 35) Evans, H.M., M.E. Simpson, W. Marx and E. Kibrik: Bioassay of the pituitary growth hormone. Width of the proximal epiphysial cartilage of the tibia in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 32:13, 1943

- 36) Ferguson, K.A. and A.L.C. Wallace: Prolactin activity of human growth hormone. *Nature* 190:632, 1961
- 37) Florini, J.R., G. Tonelli, C.B. Breuer, J. Coppola, J. Ringler and P.H. Bell: Characterization and biological effects of purified placental protein (human). *Endocrinology* 79:692, 1966
- 38) Forbes, A.P., P.H. Henneman, G.C. Griswold and F. Albright: Syndrom characterized by galactorrhea, amenorrhea and low urinary FSH: Comparison with acromegaly and normal lactation. *J. Clin. Endocr.* 14:265, 1954
- 39) Frantz, A.G. and D.L. Kleinberg: Prolactin: Evidence that it is separate from growth hormone in human blood. *Science* 170:745, 1970
- 40) Freedlender, A.E. : Practical and theoretical advantages for the use of ^{125}J in radioimmunoassay. In: *Excerpta Med.* (Amst.), ICS 151:351, 1968
- 41) Friesen, H. : Purification of a placental factor with immunological and chemical similarity to human growth hormone. *Endocrinology* 76:369, 1965
- 42) Friesen, H., B. Shome, C. Belanger, P. Hwang, H. Guyda and R. Myers: The synthesis and secretion of human and monkey placental lactogen (HPL and MPL) and pituitary prolactin (HPr and MPr). In: *Growth and Growth Hormone* (eds.: A. Pecile, E.E. Müller) *Excerpta med.* (Amst.), ICS 244: 224, 1972
- 43) Frohmann, L.A. and L.L. Bernardis: Growth hormone secretion in the rat: Metabolic clearance and secretion rates. *Endocrinology* 86:305, 1970

- 44) Ganong, W.F. and D.M. Hume: *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 92:621, 1956
- 45) Geiger, W., R. Kaiser and P. Franchimont: Comparative radioimmunological determination of human chorionic gonadotrophin, human placental lactogen, growth hormone and thyrotrophin in foetal and maternal blood after delivery. *Acta Endocr.* 68:169, 1971
- 46) Genazzani, A.R., F. Cocola, M. Casoli, G. Mello, G. Scarselli, P. Neri, P. Fioretti: Human chorionic somatomammotrophin radioimmunoassay in evaluation of placental function. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of the British Commonwealth* 78:7, 1971
- 47) Glick, S.M., J. Roth and E.T. Lonergan: Survival of endogenous human growth hormone in plasma. *J. Clin. Endocr.* 24:501, 1964
- 48) Glick, S.M., J. Roth, R.S. Yalow and S.A. Berson: Immunoassay of human growth hormone in plasma. *Nature* 199:784, 1963
- 49) Grant, D.B.: Observation on the precipitation reaction in a double antibody immunoassay for insulin. *Acta Endocr.* 59:139, 1968
- 50) Grant, D.B., S.L. Kaplan and M.M. Grumbach: Studies on the cross reaction between human growth hormone and human chorionic somatomammotrophin in radioimmunoassay systems. *J. Clin. Endocr.* 32:88, 1971
- 51) Greenspan, F.S., J.A. Cofell, W. Lew, C.T. Peng: Assay of human growth hormone with ¹³¹I-labelled antibody. *J. Lab. Clin. Med.* 59:520, 1962

- 52) Greenwood, F.C.: Evidence for the separate existence of a human pituitary prolactin - a review and results. In: Growth and Growth Hormone (eds.: Pecile, A., E.E. Müller) Excerpta med. (Amst.) ICS 244:91, 1972
- 53) Greenwood, F.C., W.M. Hunter and J.S. Glover: The preparation of ^{131}J -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem.J. 89:114, 1963
- 54) Greenwood, F.C., W.M. Hunter, A. Klopfer: Assay of human growth hormone in pregnancy at parturition and in lactation. British Med.J. 1:22, 1964
- 55) Greenwood, F.C., J. Landon and T.C.B. Stamp: The plasma sugar, free fatty acid, cortisol and growth hormone response to insulin. I. In control subjects. J. Clin. Invest. 45:429, 1966
- 55a) Grodsky, G.M. and P.H. Forsham: An immunochemical assay of total extractable insulin in man. J. Clin. Invest. 39:1070, 1960
- 56) Hachmeister, U., R. Fahlbusch and K.v. Werder: Ultra-structural identity of pituitary adenoma cells in Forbes-Albright syndrome and of adenohypophyseal pregnancy cells. 18. Symposium Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie, Acta Endocr. Suppl. 159, 1972, p.42
- 57) Hadden, D.R. and T.E. Prout: Studies on human growth hormone: I. Radioiodination. Bulletin of the John Hopkins Hospital 116:110, 1965
- 58) Hadden, D.R. and Th.E. Prout: Studies on human growth hormone: II. The effect of human serum on growth hormone labelled with radioactive iodine. Bulletin of the John Hopkins Hospital 116:122, 1965

- 59) Hadden, D.R. and Th.E. Prout: A growth hormone binding protein in normal human serum. *Nature* 202:1342, 1964
- 60) Hales, C.H. and P.D. Randle: Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate. *Biochem.J.* 88:137, 1963
- 61) Hanson, L.A., P. Roos and L. Rymo: Heterogeneity of human growth hormone preparations by immuno-gel filtration and gel filtration electrophoresis. *Nature* 212:948, 1966
- 62) Haour, F., M. Cohen, J. Bertrand: Radioimmunoassay of human chorionic somatomammotropin (HCS): Plasma levels in normal and abnormal pregnancies. *Revue Européenne D'Etudes Cliniques et Biologiques* 16:124, 1971
- 63) Herbert, V., K.S. Lau, Ch.W. Gottlieb and S.J. Bleicher: Coated charcoal immunoassay of insulin. *J.Clin.Endocr.* 25:1375, 1965
- 64) Hirschfeld, J., C.A. Gemzell, L. Wide: Immuno-electrophoretic studies on purified growth hormone. *Nature* 187:64, 1960
- 65) Hunter, W.M.: Comments on heterogeneity studies of a protein hormone. *Analyst* 88:251, 1963
- 66) Illig, R.: Growth hormone antibodies in patients treated with different preparations of human growth hormone (HGH). *J.Clin.Endocr.* 31:679, 1970
- 67) Irie, M. and R.J. Barrett: Immunologic studies of human growth hormone. *Endocrinology* 71:277, 1962
- 68) Izzo, J.L., A. Roncone and M.J. Izzo: Effect of iodination of the electrophoretic and biological behavior of insulin. *Fed.Proc.* 22:387, 1963

- 69) Josimovich, J. B. and J. A. MacLaren: Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. *Endocrinology* 71:209, 1962
- 70) Kabat, F. A. and M. M. Mayer: *Experimental Immunochemistry* 2nd Edition, 3rd Printing. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois (USA), 1961, p. 405
- 71) Kaplan, S. L. and M. M. Grumbach: Growth hormone secretion in the human fetus and in anencephaly. *Ped. Res.* 1:308, 1967
- 72) Kaplan, S. L. and M. M. Grumbach: Serum chorionic "growth hormone prolactin" and serum pituitary growth hormone in mother and fetus at term. *J. Clin. Endocr.* 25:1370, 1965
- 73) Keane, P. M., J. Pearson, W. H. C. Walker: Dextran-coated charcoal immunoassay of insulin. *Diabetologia* 4:339, 1968
- 74) Kety, S. S. and C. F. Schmidt: The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man: Theory, procedure and normal values. *J. Clin. Invest.* 27:476, 1948
- 75) Hunter, W. M.: The preparation and assessment of iodinated antigens. In: *Radioimmunoassay Methods* (eds.: K. E. Kirkham and W. M. Hunter) Churchill Livingstone, Edinburgh-London, 1971, p. 3
- 76) Kleinberg, D. L. and A. G. Frantz: Human prolactin: Measurement in plasma by in vitro bioassay. *J. Clin. Invest.* 50:1557, 1971
- 77) Kluge, F., A. C. Gerb, N. Boss, R. Fahlbusch and P. C. Scriba: Eine verbesserte fluorimetrische Cortisolbestimmung

im Serum: Diagnostische Bedeutung und therapeutische Folgerungen bei NNR-Insuffizienz. *Klin. Wo.* 48:929, 1970

- 78) Krulich, L. and S. M. McCann: Effect of GH-releasing factor and GH-inhibiting factor on the release and concentration of GH in pituitaries incubated in vitro. *Endocrinology* 85:319, 1969
- 79) Labhardt, A.: *Klinik der inneren Sekretion*. 2. neubearbeitete Auflage, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971, p. 70
- 80) Landon, J., J. Girard and F. C. Greenwood: The specificity of a radio immunoassay for human plasma ACTH. In: *Protein and Polypeptid Hormones, Part III* (ed.: M. Margoulis) *Excerpta Med. (Amst.)* ICS 161:29, 1968
- 81) Landon, J., F. C. Greenwood, T. C. B. Stamp: The plasma sugar, free fatty acid, cortisol and growth hormone response to insulin and the comparison of this procedure with other tests of pituitary and adrenal function. II. In patients with hypothalamic or pituitary dysfunction or anorexia nervosa. *J. Clin. Invest.* 45:437, 1966
- 82) Larón, Z. and S. Assa: Immunochemical studies of human pituitary growth hormone. *Acta Endocr.* 40:311, 1962
- 83) Larón, Z. and S. Mannheimer: Plasma disappearance of various ¹³¹J-labelled growth hormone preparations in man and rabbit. *Nature* 207:298, 1965
- 84) Larón, Z., S. Mannheimer and S. Guttmann: Lack of trans-placental passage of growth hormone in rabbits. *Experientia* 22:831, 1966

- 85) Laron, Z., A. Perzelan, S. Mannheimer, J. Goldmann and S. Guttman: Lack of placental transfer of human growth hormone. *Acta Endocr.* 53:687, 1966
- 86) Laron, Z., A. Yed-Lekach, S. Assa, A. Kowadlo-Silbergeld: Immunochemical properties of bovine and human pituitary growth hormone after pepsin digestion. *Endocrinology* 74:532, 1964
- 87) Li, C.H.: In: Growth hormone, Proceedings of the First International Symposium (eds.: Pecile, A. and E.E. Müller) *Excerpta med.* (Amst.) 1968, p. 7
- 88) Leininger, R.J., C.W. Cooper, R.D. Falb, G.A. Grode: Nonthrombogenic plastic surfaces. *Science* 152:1625, 1966
- 89) Li, C.H., J.S. Dixon: Human pituitary growth hormone. XXXII. The primary structure of the hormone: Revision. *Arch. Biochem. Biophys.* 146:233, 1971
- 90) Li, C.H., J.S. Dixon and D. Chung: Primary structure of the human chorionic somatomammotropin (HCS) molecule. *Science* 173:56, 1971
- 91) Li, C.H., J.S. Dixon, T.B. Lo, Y.A. Pankov, K.D. Schmidt: Amino-acid sequence of ovine lactogenic hormone. *Nature* 224:695, 1969
- 92) Li, C.H., M.M. Grumbach, S.L. Kaplan, J.B. Josimovich, H. Friesen and K.J. Catt: Human chorionic somato-mammotropin (HCS), proposed terminology for designation of a placental hormone. *Experientia* 24:1288, 1968
- 93) Li, C.H. and W.K. Liu: Human pituitary growth hormone. *Experientia* 20:169, 1964

- 94) Li, C.H. and D. Yamashiro: The synthesis of a protein possessing growth promoting and lactogenic activities. J.Amer.Chem.Soc. 92:7608, 1970
- 95) Loewenstein, J.E., I.K. Mariz, G.T. Peake and W.H. Daughaday: Prolactin bioassay by induction of N-acetyllactosamin synthetase in mouse mammary gland explants. J. Clin. Endocr. 33:217, 1971
- 96) Lyons, W.R., C.H. Li and R.E. Johnson: Biological activities of human hypophyseal mammotrophin. Program, 43rd meeting of the Endocrine Society, Thomas, Springfield 1961, p. 4
- 97) Marx, W., M.E. Simpson and H.M. Evans: Bioassay of the growth hormone of the anterior pituitary. Endocrinology 30:1, 1942
- 98) Mattingly, D.: A simple fluorimetric method for the estimation of free 11-hydroxycorticosteroids in human plasma. J. Clin. Path. 15:374, 1962
- 99) McGillivray, M.H., L.A. Frohmann and J. Doe: Metabolic clearance and production rates of human growth hormone in subjects with normal and abnormal growth. J. Clin. Endocr. 30:632, 1970
- 100) McMillan, D.R., M.M. Schmid, S.A. Eash and Ch.H. Read: Studies on the heterogeneity and serum binding of human growth hormone. J. Clin. Endocr. 27:1090, 1967
- 101) Melani, F., K.M. Bartelt, R. Conrads und E.F. Pfeiffer: Die ¹³¹J-Markierung von Insulin, ACTH und STH mit hoher spezifischer Aktivität zur Anwendung in der radioimmunologischen Methode. Z.Klin.Chem. 4:189, 1966

- 102) Merimee, T.J., J.A. Burgess, D. Rabinowitz: Sex difference in amino acid stimulation of growth hormone and insuline secretion. Clin.Res. 14:284, 1966
- 103) Merimee, T.J., D.A. Lillicrap, D. Rabinowitz: Effect of arginine on serum levels of human growth hormone. Lancet 668, 1965
- 104) Midgley, A.R., R.W. Rebar, G.D. Niswender: Radioimmunoassay employing double antibody techniques. Acta Endocr. Suppl. 142:247, 1969
- 105) Morgan, C.R. and A. Lazarow: Immunoassay of insulin using a two antibody system. Proc.Soc.Exp. Bio. Med. 110:29, 1962
- 106) Morgan, C.R., R.L. Serenson and A. Lazarow: Further studies of an inhibitor of the two antibody immunoassay system. Diabetes 13:579, 1964
- 107) Morgan, C.R., R.L. Sorensen, A. Lazarow: Studies of an inhibitor of the two antibody immunoassay system. Diabetes 13:1, 1964
- 108) Nadeau, A. and G.R. Zahnd: Corrections for protein interference in rat growth hormone immunoassay. In: Immunological Methods in Endocrinology (eds.: K. Federlin, C.N. Hales, J. Kracht) Thieme-Verlag, Stuttgart 1971, p.40
- 108a) Niall, H.D., M.L. Hogan, R. Sauer, I.Y. Rosenblum and F.C. Greenwood: Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: Evaluation from a primordial peptide by gene reduplication. Proc.Nat.Acad.Sci. 68:866, 1971
- 109) Nicoll, C.S., S.M. Blair, C.W. Nichols, Jr., S.M. Russell and M. Taylor: Prolactin and growth hormone levels in serum

- from the cavernous sinus of Rhesus monkeys. *J. Clin. Endocr.* 34:1087, 1972
- 110) Nieschlag, E.: Die klinische Bedeutung von radioimmunologischer Bestimmung von Insulin und Wachstumshormon. *Ärzteblatt Rheinland-Pfalz* 23:322, 1970
- 111) Norman, N. and A.R. Turtur: Radioimmunoassay studies with growth hormone and a pituitary lipid mobilizing factor. *Acta Endocr.* 58:318, 1968
- 112) Palmieri, G.M.A., R.S. Yalow and S.A. Berson: Adsorbent techniques for the separation of antibody-bound from free peptide hormones in radioimmunoassay. *Hormone and Metabolic Research* 3:5, 1971
- 113) Papkoff, H.: The subunit nature of interstitial cell-stimulating hormone and follicle stimulating hormone. In: *Structure-activity relationships of protein and polypeptide hormones* (eds.: Margoulies, M. and F.C. Greenwood) *Excerpta med.* (Amst.) ICS 241, 1971, p:79
- 114) Papkoff, H. and C.H. Li: Hypophyseal growth hormone. In: *Methods in Hormone Research, Vol II* (ed. R. J. Dorfman) Academic Press, New York 1962, p. 671
- 115) Parker, M. L., R.D. Utiger and W.H. Daughaday: Studies on human growth hormone. II. The physiological disposition and metabolic fate of human growth hormone in man. *J. Clin. Invest.* 41:262, 1962
- 116) Peake, G.T., D.W. McKeel, L. Jarett, W.H. Daughaday: Ultrastructural, histological and hormonal characterisation of a prolactin rich human pituitary tumor. *J. Clin. Endocr.* 29:1383, 1969

- 116a) Pickardt, C. R. : Stimulation der TSH-Sekretion durch TRH (Thyrotropin Releasing Hormone): Diagnostische Bedeutung und pathophysiologische Folgerungen. Habilitationsschrift, München, 1972
- 117) Pierce, J.G., T.H. Liao, J.S. Cornell and R.B. Carlsen: Thyrotropin and its subunits. In: Structure-activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones (eds.: Margoulies, M. and F.C. Greenwood) Excerpta med. (Amst.) ICS 241, 1971
- 118) Quabbe, H.J. : Radioimmunologische Bestimmung von Wachstumshormon im Plasma des Menschen. Z.Klin.Chem. 7:259, 1969
- 119) Read, C.H. and G.T. Bryon: Immunological studies of human growth hormone. In: Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology 13:68, Churchill, London 1960
- 120) Recant, L. and P.E. Lacy: Non-puerperal galactorrhea, amenorrhea and visual loss. Am.J.Med. 33:591, 1962
- 121) Riggi, S.J., C.R. Boshart, P.H. Bell and I. Ringler: Some effects of purified placental protein (human) on lipid and carbohydrate metabolism. Endocrinology 79:709, 1966
- 122) Rimoin, D.L., G.B. Holzman, T.J. Merimee, D. Rabinowitz, A.C. Barnes, J.E.A. Tyson and V.A. McKusick: Lactation in the absence of human growth hormone. J. Clin. Endocr. 28:1183, 1968
- 123) Rhode, W. and G. Dörner: Immunochemical studies on the heterogeneity of human growth hormone (HGH). Acta Endocr. 60:101, 1969
- 124) Rodbard, D., H.J. Ruder, J. Vaitukaitis and H.S. Jacobs: Mathematical analysis of kinetics of radioligand assays;

improved sensitivity obtained by delayed addition of labelled ligand. *J. Clin. Endocr.* 33:343, 1971

- 124a) Rodbard, D., P. L. Rayford and G. T. Ross: Statistical quality control of radioimmunoassays. In: *Statistics in Endocrinology* (eds.: J. W. McArthur and Th. Colton) The MIT Press, Cambridge-London 1970, p. 411
- 124b) Rosa, U.: A method for protein labelling with radioiodine. In: *Nuklearmedizin, Beilage zu Atompraxis, Heft 6*, 1966
- 124c) Roos, P., H. R. Fevold, C. A. Gemzell: Preparation of human growth hormone by gel filtration. *Biochem. biophys. Acta (Amst.)* 74:525, 1963
- 125) Roth, J. S., S. M. Glick, R. S. Yalow, S. A. Berson: Hypoglycemia: A potent stimulus to secretion of growth hormone. *Science* 140:987, 1963
- 126) Roth, J., Glick, S. M., R. S. Yalow and S. A. Berson: Secretion of human growth hormone: Physiologic and experimental modification. *Metabolism* 12:577, 1963
- 127) Roth, J., P. Gordon and J. Pastan: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 61:138, 1968
- 128) Samols, E. and D. Bilkus: A comparisons of insulin immunoassays. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115:79, 1964
- 129) Santis, M. R., E. G. Lowrie, C. L. Hampers, J. S. Soeldner: Diffusion of human growth hormone into thoracic duct lymph in man. *J. Clin. Endocr.* 31:632, 1970
- 130) Scatchard, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51:660, 1949

- 131) Schally, A.V. and A. Arimura: Growth hormone - releasing hormone (GH - RH) of the hypothalamus, its chemistry and in vivo and in vitro effects. Proc. Int. Symp. Growth Hormone, Mailand 1971 (eds.: A. Pecile und E.E. Müller) Excerpta med. (Amst.) ICS 236, p. 10
- 132) Schalch, D.S.: Use of ^{125}J -labelling in radioimmunoassay, Proc. Soc. Exper. Bio. Med. 121:1279, 1966
- 133) Schröder, K.E.: Radioimmunoassay for human growth hormone: Problems and characteristics. Immunological Methods in Endocrinology (eds.: K. Federlin, C.N. Hales, J. Kracht) G. Thieme-Verlag, Stuttgart 1971, p. 36
- 134) Scriba, P.C., R. Hacker, P. Dieterle, F. Kluge, W. Hochheuser und K. Schwarz: ACTH-Bestimmung im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis. Kli. Wo. 44:1393, 1966
- 135) Skom, J.H. and Talmage, D.W.: The role of non precipitating insulin antibodies in diabetes. J. Clin. Invest. 37:783, 1958
- 135a) Souvatzoglou, A.: Zur klinischen Bedeutung der radioimmunologischen LH-Bestimmung und der Stimulation der LH-Sekretion. Habilitationsschrift, München, 1972
- 136) Squire, P.G. and K.O. Pedersen: J. Amer. Chem. Soc. 83:476, 1961
- 137) Steiner, H., O. Dahlbäck and J. Waldenström: Ectopic growth hormone production and osteoarthropathy in carcinoma of the bronchus. Lancet p. 783, 1968
- 138) Steiner, D.F., P. Cunningham, L. Spigelman and B. Ate: Science 157:697, 1967
- 139) Stuart, M.C., L. Lazarus and K.A. Ferguson: The circulating forms of growth hormone. In: Second International Sympo-

sium on Growth Hormone, Milan 1971, Excerpta med.
(Amst.) ICS 236:23

- 140) Tashjian, A. H. Jr., L. Levine and A. E. Wilhelmi: Immunochemical studies with antisera to fractions of human growth hormone which are high or low in pigeon crop gland-stimulating activity. *Endocrinology* 77:1023, 1965
- 141) Taylor, A. L., J. L. Finster and D. H. Mintz: Metabolic clearance and production rates of HGH. *J. Clin. Invest.* 48: 2349, 1969
- 142) Touber, J. L. and D. Maingay: Heterogeneity of human growth hormone. Its influence on a radioimmunoassay of the hormone in serum. *Lancet* p.1403, 1963
- 143) Turkington, R. W.: Measurement of prolactin activity in human serum by the induction of specific milk proteins in mammary gland in vitro. *J. Clin. Endocr.* 33:210, 1971
- 144) Utiger, R. D., M. L. Paker and W. H. Daughaday: Studies on human growth hormone. I. A radioimmunoassay for human growth hormone. *J. Clin. Invest.* 41:254, 1962
- 145) Valenta, L. and M. L. Aubert: Analysis of radioimmunoassay by disc electrophoresis and sucrose gradient centrifugation. *Acta Endocr.* 66:257, 1971
- 146) Varma, S. K., P. H. Sonksen, K. Varma, J. S. Soeldner, H. A. Selenkow, K. Emerson: Measurement of human growth hormone in pregnancy and correlation with human placental lactogen. *J. Clin. Endocr.* 32:328, 1971
- 147) Werder, K. v., M. Gottsmann, A. Souvatzoglou, P. Bottermann and K. Schwarz: Growth hormone and growth hormone like-immunoreactivity in man. *Acta Endocr. (Kbh.) Suppl.* 159:43, 1972

- 147a) Werder, K. v., C. Desalm, R. Ermler und M. Gottsmann:
Biologische und immunologische Aktivität von exogenem
HGH. *Acta Endocr. Suppl.* 173:99, 1973
- 148) Werder, K. v., M. Gottsmann, A. Souvatzoglou: Immuno-
logische Reaktivität von humanem Wachstumshormon (HGH)
und Chorionsomatotrophin (HCS). In Vorbereitung
- 149) Werder, K. v., und K. Schwarz: Regulation der Sekretion
von Wachstumshormon beim Menschen. *DMW* 96:2012, 1971
- 149a) Westphal, O.: Human growth hormone. A methodological and
clinical study. Dissertation, Uppsala 1968
- 149b) Werder, K. v., P. Bottermann und P. Hartmann: Die Bedeu-
tung der oralen Glukosebelastung bei der Diagnose der Akro-
megalie. *Med. Klin.* 43:1398, 1972
- 150) Daughaday, W.H.: The adenohipophysis. In: Textbook of
Endocrinology (ed. R.H. Williams) Fourth edition, W.B.
Saunders Company, Philadelphia-London-Toronto, 1968, p. 27
- 150a) Wilhelmi, A.E., J.B. Fishman and J.A. Russell: A new
preparation of crystalline anterior pituitary growth hormone.
J. biol. Chem. 176:735, 1948
- 151) Wool, M.S. and H.A. Selenkov: Charcoal-dextran radioimmu-
noassay of human growth hormone. *Acta Endocr.* 57:109,
1968
- 152) Yalow, R.S. and S.A. Berson: Immunoassay of endogenous
plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39:1157, 1960
- 153) Yalow, R.S. and S.A. Berson: Size and charge distinctions
between endogenous human plasma gastrin in peripheral blood
and heptadecapeptide gastrins. *Gastroenterology* 58:609, 1970

- 154) Yalow, R.S. and S.A. Berson: Problems of validation of radioimmunoassays. In: Principles of competitive protein-binding assays (eds.: W.D. Odell and W.H. Daughaday) J.B. Lippincott Company, Philadelphia 1970, p. 374
- 155) Yalow, R.S. and S.A. Berson: Immunoassay of plasma insulin. Meth. Biochem. Anal. 12:69, 1964
- 156) Yen, S.C., N. Samaan and O.H. Pearson: Growth hormone levels in pregnancy. J. Clin. Endocr. 27:1341, 1967
- 157) Zahnd, G.R., J. Steinke, A.E. Renold: Early metabolic effects of human growth hormone. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105:455, 1960

LEBENS LAUF

Am 20.10.1946 wurde ich als erstes Kind des Arbeiters Lorenz Gottsmann und seiner Frau Maria Gottsmann, geb. Adler, in Traunstein geboren. Von 1953 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Traunstein und anschließend den math.-naturw. Zweig des Chiemgaugymnasiums Traunstein, wo ich 1967 das Reifezeugnis erhielt. Seit dem Wintersemester 1967/68 studiere ich Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität München. Im Oktober 1968 bestand ich die naturwissenschaftliche und im April 1970 die ärztliche Vorprüfung. Ab November 1970 arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation im Labor für experimentelle Endokrinologie der II. Medizinischen Klinik der Universität München. Nach dem Wintersemester 1972/73 werde ich mein Staatsexamen ablegen.

Seit September 1972 bin ich mit Elisabeth Gottsmann, geb. Mader, verheiratet.

